

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ISABELLA MÁRCIA SOARES NOGUEIRA TEOTÔNIO

**EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIOS DE ESPÉCIES DE *Pouteria spp.* SOBRE
MACRÓFAGOS MURINOS RAW 264.7 ESTIMULADOS COM LPS**

BRASÍLIA-DF

2015

ISABELLA MÁRCIA SOARES NOGUEIRA TEOTÔNIO

**EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIOS DE ESPÉCIES DE *Pouteria spp.* SOBRE
MACRÓFAGOS MURINOS RAW 264.7 ESTIMULADOS COM LPS**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da
Saúde, Universidade de Brasília, como
requisito parcial à obtenção do título de Mestre
em Ciências Farmacêuticas.**

Orientadora: Profa. Dra. Yanna Karla de Medeiros Nóbrega

BRASÍLIA-DF

2015

ISABELLA MÁRCIA SOARES NOGUEIRA TEOTÔNIO

**EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIOS DE ESPÉCIES DE *Pouteria spp.* SOBRE
MACRÓFAGOS MURINOS RAW 264.7 ESTIMULADOS COM LPS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Yanna Karla de Medeiros Nóbrega (Presidente)

Universidade de Brasília

Profa. Dra. Yris Maria Fonseca Bazzo

Universidade de Brasília

Profa. Dra. Mariana Machado Hecht

Universidade de Brasília

Profa. Dra. Pérola Oliveira Magalhães (Suplente)

Universidade de Brasília

DEDICATÓRIA

À minha querida vó Flora (*in memoriam*) por todo amor, dedicação e orgulho que sentia por mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos, que me deu forças e permitiu que eu seguisse em frente para a conclusão desse trabalho.

Agradeço a minha mãe Maria Abadia Nogueira e ao meu irmão Rafael Henrique que sempre me apoiaram e confiaram em mim.

Ao meu esposo amado Marcelo Henrique Teotônio por todo apoio, compreensão, dedicação e carinho.

À minha querida orientadora Yanna Karla Medeiros de Nóbrega, que sempre acreditou na minha capacidade, por sempre ser otimista e me mostrar o lado bom das coisas, por toda paciência e pelo conhecimento transmitido.

Ao professor Riccardo Pratesi que é um exemplo de profissional, uma pessoa maravilhosa, simples e humilde, pelas palavras de apoio e por ter contribuído no desenvolvimento desse trabalho.

Aos amigos do laboratório que me auxiliaram nos experimentos, ou compartilhando de suas experiências, em especial à Patrícia Fritsch que me transmitiu seus conhecimentos sobre a técnica qPCR e principalmente à Zita Lopes da Silva, que esteve todo tempo ao meu lado, em todos os momentos, seja ajudando na pesquisa ou me consolando nas horas difíceis, levantando minha autoestima.

À Adriana Pratesi e a Cristina Simeoni, pelo carinho, paciência, pelos momentos partilhados de conversas e brincadeiras além de todo suporte nas pesquisas.

A todos os integrantes do Laboratório Interdisciplinar de Biociências.

Ao Laboratório de Produtos Naturais da Faculdade de Ciências da Saúde, da Universidade de Brasília (UnB), em especial às professoras Dâmaris Silveira, Yris Fonseca e Pérola Magalhães por ter cedido os extratos utilizados no presente trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro ao projeto.

“Porque o Senhor dá a sabedoria e da sua boca é que vem o conhecimento e o entendimento. Ele reserva a verdadeira sabedoria para os retos. Escudo é para os que caminham na sinceridade, para que guardem as veredas do juízo. Ele preservará o caminho dos seus santos. Então entenderás a justiça, o juízo, a equidade e todas as boas veredas. Pois quando a sabedoria entrar no teu coração, e o conhecimento for agradável à tua alma, o bom senso te guardará e a inteligência te conservará para te afastar do mau caminho, e do homem que fala coisas perversas” **Provérbios 2:6-12.**

RESUMO

Teotônio, Isabella Márcia Soares Nogueira. Efeitos anti-inflamatórios de espécies de *Pouteria spp.* sobre macrófagos murinos RAW 264.7 estimulados com LPS. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). 2015. Faculdade de Ciências da Saúde. Universidade de Brasília.

A inflamação compreende um mecanismo biológico complexo e altamente regulado de defesa do organismo em resposta a diversos estímulos. É dividida em duas fases, aguda e crônica. A inflamação aguda geralmente é benéfica ao hospedeiro, reestabelecendo em pouco tempo a estrutura e função do tecido e/ou órgão. Entretanto, nem sempre as respostas inflamatórias ocorrem dessa forma, e condições anormais de resposta inflamatória tornam-se crônicas, promovendo a perda da função do órgão ou tecido, e o desenvolvimento de doenças. As doenças inflamatórias crônicas afetam milhões de pessoas ao redor do mundo. O desenvolvimento de medicamentos anti-inflamatórios eficazes e seguros deve ser uma prioridade, pois entre os disponíveis comercialmente são relatados vários efeitos colaterais, o que limita a aplicação desses agentes. Assim, o desenvolvimento de uma terapia segura, eficaz e econômica para o tratamento de doenças inflamatórias ainda representa um grande desafio. Neste cenário, as plantas medicinais asseguram uma posição de destaque como fonte de moléculas bioativas naturais. As espécies de *Pouteria* têm sido utilizadas como plantas medicinais por apresentarem muitas atividades biológicas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade anti-inflamatória de extratos de *Pouteria torta* e *Pouteria ramiflora* em macrófagos RAW 264.7 inflamados com 1 µg/mL de LPS. A viabilidade das células e a citotoxicidade foram avaliadas por meio de duas metodologias, WST-8 e vermelho neutro, e a resposta inflamatória foi analisada através de expressão gênica empregando a técnica PCR em tempo real, e pela dosagem dos mediadores óxido nítrico (NO) e prostaglandina (PGE₂), pelas metodologias de espectrofotometria e ELISA respectivamente. Ensaio adicional de atividade antioxidante empregando esta mesma metodologia foi empregado para a dosagem de glutathiona (GSH). Nossos resultados demonstraram que nas concentrações 0,078, 0,039, 0,020 mg/mL todos os extratos testados não apresentam toxicidade e apresentaram atividade anti-inflamatória e antioxidante em células RAW 264.7 estimuladas com LPS, reduzindo os níveis de NO, PGE₂ e GSH, e modulando negativamente a expressão dos transcritos dos genes marcadores de inflamação *COX-2*, *IL-6*, *iNOS*, *TNF-α* e *NF-κB*, o que demonstra que esses extratos apresentam grande potencial terapêutico como anti-inflamatórios.

Palavras chaves: Inflamação, *Pouteria spp.*, Cerrado, anti-inflamatório, expressão gênica.

ABSTRACT

Teotônio, Isabella Márcia Soares Nogueira. Anti-inflammatory Effects of species of *Pouteria* spp. on RAW 264.7 murine macrophages stimulated with LPS. Dissertation (Master's degree in Pharmaceutical Sciences). 2015. Faculty of Health Sciences. University of Brasilia.

The biological mechanism of inflammation have been considered as complex and highly regulated in the body's defense response to various stimuli and is divided into two phases, such as acute and chronic. Acute inflammation is generally beneficial to the host, reestablishing in a short time the structure and function of tissue and/or organ. However, inflammatory responses do not always occur in such way. Abnormal conditions and inflammatory response become chronic, promoting loss of organ or tissue function, possibly developing diseases. Chronic inflammatory diseases affect millions of people around the world. The development of effective anti-inflammatory and safe drugs should be a priority since side effects among a variety, commercially available, have been reported limiting the application of these agents. Thus, the development of a safe, effective and economic therapy for treatments of inflammatory diseases also present a challenge. In this scenario, medicinal plants ensure a prominent position as a source of natural bioactive molecules. The *Pouteria* species have been used as a medicinal plant due to its various biological activities. The objective of this study was to evaluate the anti-inflammatory activity of *Pouteria torta* and *Pouteria ramiflora* extracts in macrophages inflamed with 1µg / ml LPS RAW 264.7. Cell viability and cytotoxicity were assessed by three methods, WST-8 and neutral red, and the inflammatory response was analyzed by gene expression utilizing the PCR technique in real time, and the dosage of the oxide mediators nitrate (NO) and prostaglandin (PGE2) by spectrophotometric methods and ELISA. Further testing of antioxidant activity using the same methodology was used for the dosage of glutathione (GSH). Our results showed that all tested extracts in the concentrations 0.078, 0.039, 0.020 mg / mL, demonstrated no toxicity and showed anti-inflammatory and antioxidant activity in RAW 264.7 cells stimulated with LPS, reducing the levels of NO, PGE2 and GSH. All extracts were modulating negatively the expression of transcripts of genes markers of inflammation COX-2, IL-6, iNOS, TNF-α and NF-kB, demonstrating that these extracts have significant therapeutic potential as an anti-inflammatory.

Key words: Inflammation, *Pouteria* spp., Cerrado, anti-inflammatory, gene expression.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mecanismos de migração dos leucócitos através dos vasos sanguíneos.....	4
Figura 2 - Mecanismos associados à inflamação aguda e sua resolução, além da perda de função por fibrose e inflamação crônica.....	5
Figura 3 - Cascata de produção dos metabólitos do ácido araquidônico.....	10
Figura 4 - Distribuição geográfica do gênero <i>Pouteria</i> , destacado em vermelho	16
Figura 5 - <i>Pouteria ramiflora</i> (Mart.) Radlk, (A) Folhas e (B) frutos.....	18
Figura 6 - <i>Pouteria torta</i> (Mart.) Radlk, (A) folhas e (B) frutos.....	19
Figura 7 - Delineamento experimental desenvolvido durante o estudo.....	24
Figura 8 - Produção de óxido nítrico (NO) no sobrenadante da cultura de macrófagos RAW 264.7 estimulados com diferentes concentrações (0,25, 0,5 e 1,0 µg/mL) de LPS.....	37
Figura 9 - Produção de óxido nítrico no sobrenadante de células Raw 264.7 numa concentração de 5×10^6 estimuladas com 1µg/mL de LPS nos tempos de 6, 18, 24, 48 e 72 horas.....	38
Figura 10 - Análise da interação química entre os extratos de <i>Pouteria torta</i> (PT2) e <i>Pouteria ramiflora</i> (PR3 e PR4) nas diferentes concentrações utilizadas e o reagente de WST-8 (<i>Cell Counting kit-8</i>).....	39
Figura 11 - Efeito dos extratos de <i>Pouteria torta</i> (PT2) e <i>Pouteria ramiflora</i> (PR3 e PR4) sobre a viabilidade celular de células RAW 264.7, nas concentrações viáveis de serem analisadas pelo método de WST-8.....	40
Figura 12 - Análise da interação química entre os extratos de <i>Pouteria torta</i> (PT2) e <i>Pouteria ramiflora</i> (PR3 e PR4) nas diferentes concentrações utilizadas e o reagente vermelho neutro.....	41
Figura 13 - Efeitos dos extratos de <i>Pouteria torta</i> (PT2) e <i>Pouteria ramiflora</i> (PR3 e PR4) sobre a viabilidade celular de células RAW 264.7, analisadas conforme o método de incorporação do vermelho neutro	42

Figura 14 - Modulação da expressão gênica de células RAW 264.7 após tratamento com o extrato etanólico de <i>P. torta</i> (PT2).....	44
Figura 15 - Modulação da expressão gênica de células RAW 264.7 após tratamento com o extrato aquoso de <i>Pouteria ramiflora</i> (PR3)	46
Figura 16 - Modulação da expressão gênica de células RAW 264.7 após tratamento com o extrato etanólico de <i>Pouteria ramiflora</i> (PR4)	48
Figura 17 - Níveis de produção de óxido nítrico no sobrenadante de macrófagos RAW 264.7 incubados com os extratos PT2, PR3 e PR4 nas concentrações: (0,078 mg/mL, 0,039 mg/mL e 0,020 mg/mL) e estimulados com 1µg/mL de LPS, durante 48 horas.....	50
Figura 18 - Efeito inibitório da produção de PGE ₂ sobre macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS após 48h de tratamento com extratos PT2, PR3 e PR4 nas concentrações 0,078, 0,039 e 0,020 mg/mL.....	51
Figura 19 - Produção de Glutathiona em macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS após 48h de tratamento com extratos PT2, PR3 e PR4 nas concentrações 0,039 e 0,020 mg/mL.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lista de espécies de plantas utilizadas no estudo.....	21
Tabela 2 - Informações técnicas dos extratos das plantas testados.....	22
Tabela 3 - Genes de macrófagos RAW 264.7 analisados no estudo.....	29
Tabela 4 - Sequência dos <i>Primers</i> dos genes investigados por reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR).....	31
Tabela 5 - <i>Threshold</i> , quantidades de <i>primers</i> e de cDNA e condições de termociclagem padronizadas para cada <i>primer</i> a partir dos ensaios de curva padrão e otimização, para amplificação do qPCR.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA - Análise de variância
ATCC - *American Type Culture Collection*
AA - Ácido araquidônico
AINES - Anti-inflamatórios não esteroidais
Blk - Branco
COX - Ciclooxigenase
COX- 1 - Ciclooxigenase isoforma 1
COX- 2 - Ciclooxigenase isoforma 2
CO₂ - Dióxido de Carbono
cDNA - Sequência de DNA complementar
CT - *Crossing threshold* ou ciclo limiar
PLA2 - Fosfolipases A2
D.O. - Densidade ótica
DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
DMSO - Dimetil sulfoxido
DNA - Ácido desoxirribonucleico
DNase - Desoxirribonuclease
dNTP - Desoxinucleotídeos 5'-trifosfato
eNOS - Óxido nítrico sintase endotelial
ELISA - *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*
FC - *Fold-change*
x g - Força Gravitacional
GAPDH - Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GSH - Glutathiona reduzida
H₃PO₄ - Ácido ortofosfórico
IFN-g - Interferon gama
IL - Interleucina
IL-1 - Interleucina-1
IL-6 - Interleucina- 6
iNOS - Óxido nítrico sintase induzida

LOX - Lipooxigenase
LPS - Lipopolissacarídeo
LTB4 - Leucotrieno B4
Mili-Q - Água reagente tipo 1 livre de Rnase
MTT - 3-(4,5dimetiliazol-2-il)-2,5- difenil tetrazol – sal de tetrazólio
NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)
NEED - *N- (1-Naphthyl) ethyl-enedinamine*
NF-kB - Fator de transcrição nuclear kb
nNOS - Óxido nítrico sintase neuronal
NO - Óxido nítrico
NO₂ - Nitrito
N₂O₃ - Trióxido de dinitrogênio
OMS - Organização Mundial de Saúde
p - Significância estatística
PBS - Salina fosfatada tamponada
PGE₂ - Prostaglandina E2
PMN - Polimorfonucleares
PT2 - Extrato etanólico de *Pouteria torta*
PR3 - Extrato aquoso de *Pouteria ramiflora*
PR4 - Extrato etanólico de *Pouteria ramiflora*
pH - Potencial hidrogeniônico
RNA - Ácido ribonucleico
RNAm - Ácido Ribonucleotídeo mensageiro
RNase - Ribonuclease
RT - Transcrição Reversa
SBF - Soro fetal bovino
SYBR *Green* ou *SyBrgreen* - Corante fluorescente que se liga a fita de DNA
TA - Atividade total
TLR - *Toll like* receptor
T_m - *Melting temperature* ou temperatura de dissociação
TNF- α - Fator de Necrose Tumoral alfa (α)
Tnf- α - Gene que codifica a citocina Tnf- α
TNF- α - Fator de necrose tumoral-alfa

Tracer - Enzima acetilcolinesterase ligada a prostaglandina

TXA2 - Tromboxano A2

WST-8 - Sal monossódico de tetrazólio [2- (2-metoxi-4-nitrofenil) -3- (4-nitrofenil) -5- (2,4-dissulfofenil) 2H-tetrazólio].

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	II
EPÍGRAFE	III
RESUMO	IV
ABSTRACT	V
LISTA DE FIGURAS	VI
LISTA DE TABELAS	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS	IX
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Inflamação	1
1.1.1. Inflamação Aguda.....	2
1.1.2. Inflamação Crônica.....	5
1.2. Mediadores da inflamação	7
1.2.1. Óxido Nítrico (NO)	7
1.2.2. Metabólitos do ácido araquidônico.....	8
1.2.3. Citocinas.....	10
1.2.3.1 <i>Citocinas Pró-inflamatórias</i>	11
1.2.3.2 <i>Citocinas anti-inflamatórias</i>	12
1.3. Tratamento convencional e suas limitações	12
1.4. Substâncias de origem vegetal como fonte de novos fármacos	13
1.5. Atividades biológicas de plantas medicinais do Cerrado brasileiro	15
1.5.1. O gênero <i>Pouteria</i> (<i>Sapotaceae Juss.</i>)	15
2. OBJETIVOS	20
2.1. Objetivo Geral	20
2.2. Objetivos Específicos	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1. Material botânico	21
3.2. Extração botânica	21
3.3. Linhagem celular	22
3.4. Cultura de células	22

3.5. Cinética de ativação da linhagem celular RAW 264.7	23
3.6. Delineamento experimental	24
3.7. Avaliação da viabilidade celular após interação com os extratos de plantas	24
3.7.1. Ensaio de WST-8.....	24
3.7.2. Ensaio de Vermelho Neutro.....	26
3.8. PCR em tempo real (qPCR)	27
3.8.1. Extração e purificação de RNA.....	27
3.8.2. Análise do RNA extraído.....	28
3.8.3. Síntese de Cdna.....	28
3.8.4. Definição dos genes de interesse para o estudo.....	29
3.8.5. Padronização das concentrações dos primers específicos.....	30
3.8.6. Titulação dos <i>Primer</i>	31
3.8.7. Ensaio de eficiência.....	32
3.8.8. Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em Tempo Real (q-PCR).....	32
3.8.9. Expressão gênica.....	33
3.9. Dosagem de Óxido Nítrico (NO)	34
3.10. Dosagem de PGE2	34
3.11. Ensaio da Glutathiona	35
3.12. Análise estatística	36
4. RESULTADOS	37
4.1. Avaliação da cinética de ativação da linhagem celular RAW 264.7	37
4.2. Avaliação de diferentes concentrações celulares numa cinética de ativação da linhagem celular RAW 264.7 com 1µg/µL de LPS	38
4.3. Ensaio para avaliação da viabilidade celular após interação com os extratos de plantas	39
4.3.1. Ensaio utilizando como reagente WST-8.....	39
4.3.1.1. <i>Interação dos extratos das plantas com o reagente WST-8</i>	39
4.3.1.2. <i>Efeito dos extratos das plantas sobre a viabilidade celular de RAW 264.7 pelo método de WST-8</i>	40

4.3.2. Ensaio utilizando como reagente Vermelho Neutro.....	41
4.3.2.1. <i>Interação dos extratos das plantas com o reagente Vermelho Neutro</i>	41
4.3.2.2. <i>Efeito dos extratos sobre a viabilidade celular de RAW 264.7 pelo método de Vermelho Neutro</i>	42
4.4. Expressão gênica	43
4.4.1. Quantificação relativa dos transcritos dos genes <i>NFkb, Tnfα, IL-6, iNOS e Cox-2</i> após tratamento com extrato etanólico de <i>Pouteria torta</i> (PT2).....	43
4.4.2. Quantificação relativa dos transcritos dos genes <i>NFkb, Tnfα, IL-6, iNOS e Cox-2</i> após tratamento com extrato aquoso de <i>Pouteria ramiflora</i> (PR3).....	45
4.4.3. Quantificação relativa dos transcritos dos genes <i>NFkb, Tnfα, IL-6, iNOS e Cox-2</i> após tratamento com extrato etanólico de <i>Pouteria ramiflora</i> (PR4).....	47
4.5. Dosagem de Óxido Nítrico	49
4.6. Dosagem de Prostaglandina E₂ (PGE₂)	50
4.7. Dosagem de Glutathiona (GSH)	51
5. DISCUSSÃO	53
6. CONCLUSÃO	61
REFERÊNCIAS	62

1. INTRODUÇÃO

1.1. Inflamação

A palavra inflamação, derivada do latim *inflammare* que significa em chamas, é um fenômeno que passou por várias mudanças conceituais ao longo do tempo, sendo descrita inicialmente por Aulus Cornelius Celsus, um escritor egípcio do primeiro século d.C., há aproximadamente 2000 anos, definida de forma limitada por quatro sinais cardinais: *rubor et tumor cum calore et dolore*, com uma tradução para *rubor* de vermelhidão, de *tumor* para edema, com *calore et dolore* traduzidas como aquecimento e dor. Dessa forma, a sua definição compreendia apenas a combinação de sinais clínicos e sintomas e não a fisiopatologia específica. Dois séculos depois de Celsus, Galen propôs um modelo sobre uma visão humoral da inflamação, em que a inflamação e o “pus”, especificamente, faziam parte de uma resposta benéfica à injúria, ao contrário de uma patologia sobreposta. Essa visão humoral persistiu no século XIX quando, em 1871, Rudolf Virchow acrescentou o quinto sinal cardinal, a perda da função, demonstrando que a inflamação estava intimamente ligada a processos patológicos (SCOTT *et al.*, 2004; PERKINS *et al.*, 2010).

Posteriormente, na década de 1880, Elie Metchnikoff, biólogo russo, por meio de duas observações experimentais (ingestão de espinhos de rosas por amebócitos de larvas de estrela do mar e ingestão de bactérias por glóbulos brancos de mamíferos), reconheceu a inflamação como um processo fagocítico, em que o seu objetivo principal era conduzir as células fagocíticas para as áreas onde houvessem lesões e englobar o agente invasor. Além disso, Thomas Lewis, ao estudar a resposta inflamatória na pele, descobriu que existem moléculas, como a histamina, produzidas no sítio da inflamação, que medeiam as alterações vasculares desta. Esses eventos representam a base subjacente para importantes conclusões sobre os mediadores químicos da inflamação e o uso de medicamentos anti-inflamatórios na medicina clínica (HEIFETS, 1982; SCOTT *et al.*, 2004; PERKINS *et al.*, 2010).

Atualmente, a inflamação compreende um mecanismo biológico complexo e altamente regulado de defesa do organismo em resposta a diversos estímulos, físicos, químicos e patológicos (YING *et al.*, 2013; CHOI *et al.*, 2014), e que tem por finalidade o restabelecimento da cura (LEE *et al.*, 2010).

Uma resposta inflamatória (RI) normal geralmente é benéfica ao hospedeiro, reestabelecendo em pouco tempo a estrutura e função do tecido e/ou órgão. Entretanto, nem sempre as respostas inflamatórias ocorrem dessa forma, e condições anormais de RI podem

promover perda da função do órgão ou tecido, e a cronicidade nesta resposta, levando ao desenvolvimento de doenças (LAWRENCE, 2002; HANADA E YOSHIMURA, 2002).

1.1.1. Inflamação Aguda

A inflamação aguda é uma resposta imediata, autolimitada e benéfica da microcirculação, responsável por restaurar a estrutura e a função tecidual. Essa resposta é mediada pela imunidade inata, e em alguns casos, pela imunidade adaptativa, as quais juntas compõem o sistema imunitário do hospedeiro (LAWRENCE *et al.*, 2002).

As reações inflamatórias podem ser desencadeadas por diversos estímulos como: infecções (bacterianas, virais, fúngicas, parasitárias e toxinas microbianas); reações autoimunes ou de hipersensibilidade, em que o sistema imunitário destrói os próprios tecidos do indivíduo; necrose tecidual em decorrência de isquemia, trauma ou lesões por agentes físicos e químicos (lesão térmica, irradiação e exposição a alguns produtos químicos, entre outros agentes); hipóxia, que é mediada pela proteína Fator Indutor de Hipóxia (HIF-1 alfa), produzida pelas células privadas de oxigênio que possuem a capacidade de ativar a transcrição de muitos genes envolvidos na inflamação, e, finalmente, outros estímulos como corpos estranhos e suturas cirúrgicas, que possuem a capacidade de causar lesão tecidual traumática ou de transportar micro-organismos (KUMAR *et al.*, 2013).

A inflamação aguda é caracterizada por uma sequência de eventos complexos altamente coordenados que envolvem um grande número de mudanças fisiológicas, celulares e moleculares, e que se inicia com a produção de mediadores solúveis como o sistema complemento, quimiocinas, citocinas, eicosanóides, incluindo as prostaglandinas, radicais livres, aminas vasoativas entre outras, que são produzidas pelas células residentes no local inflamado como: macrófagos, células dendríticas, linfócitos, células endoteliais, fibroblastos e mastócitos, amplificando a resposta imunitária (LAWRENCE *et al.*, 2002; BUCKLEY *et al.*, 2015).

A resposta vascular aguda envolve principalmente o endotélio, ocorre dentro de segundos após a formação da lesão tecidual, e é responsável por induzir vasodilatação e o aumento da permeabilidade da parede capilar. Isso leva ao aumento do fluxo sanguíneo (hiperemia), aumento do eritema, e a entrada de líquido extracelular nos tecidos formando o edema, onde fibroblastos do tecido residente e células epiteliais são ativados (BUCKLEY *et*

al., 2015). O aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular também contribuem para um maior tráfego celular de leucócitos polimorfonucleares, para a liberação de mediadores tóxicos, e em algumas situações, perda de função do órgão afetado. Essas respostas fisiológicas levam às características clínicas cardinais da inflamação: rubor, calor, edema, dor e perda da função (LAWRENCE *et al.*, 2002; LYMAN *et al.*, 2014; BUCKLEY *et al.*, 2015).

Dentre os leucócitos polimorfonucleares predominantes nessa fase, encontram-se os neutrófilos que, posteriormente, são seguidos pelos monócitos, que se diferenciam em macrófagos no tecido (LAWRENCE *et al.*, 2002).

Os neutrófilos são as células mais abundantes nas doenças inflamatórias agudas, constituindo a primeira linha de defesa do organismo do hospedeiro contra o patógeno, sendo também encontrados em doenças inflamatórias crônicas. Sua função primária é conter e destruir o patógeno invasor. A migração dos neutrófilos para a área lesionada, bem como sua ativação, ocorre por meio dos seguintes eventos: quimiotaxia (migração do neutrófilo para o local da inflamação através dos mediadores quimiotáticos, que se ligam a receptores dos neutrófilos liberando cálcio e aumentando a motilidade do neutrófilo); marginalização (deslocamento dos neutrófilos para a periferia dos vasos, por ação de fibrinogênios e dos eritrócitos agregados nas vênulas); rolamento na superfície endotelial, pela ação de moléculas de adesão da família das selectinas e adesão através das integrinas; diapedese (transmigração dos neutrófilos através da membrana basal do endotélio das vênulas ao tecido intersticial), e, finalmente, fagocitose (mediada pela opsonização, ingestão e destruição dos patógenos) (Figura 1) (KUMAR *et al.*, 2013; RIBEIRO *et al.*, 2015).

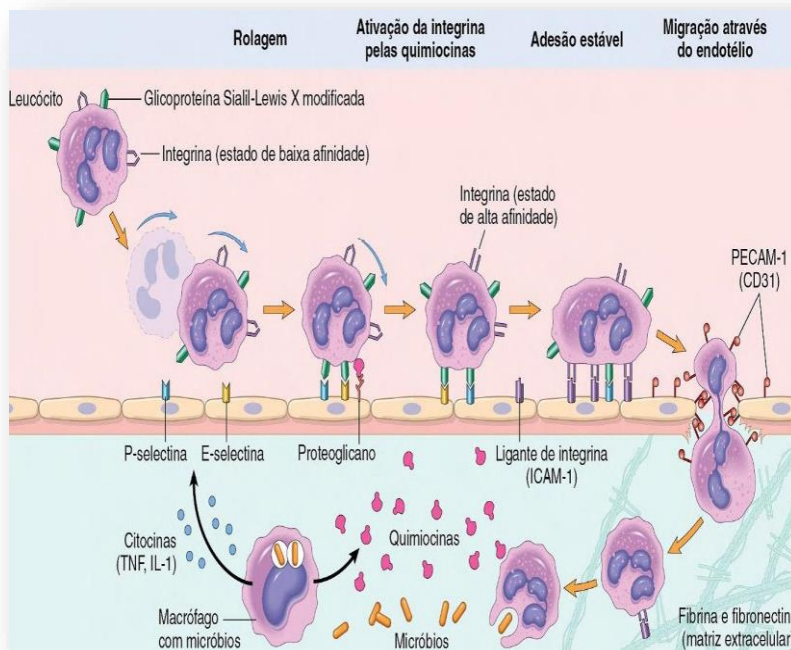


Figura 1 - Mecanismos de migração dos leucócitos através dos vasos sanguíneos. Inicialmente os leucócitos rolam, tornam-se ativados e aderem ao endotélio, após, migram pelo endotélio, penetrando na membrana basal, seguindo em direção aos quimioatraentes liberados na fonte da lesão. Diversas moléculas são predominantes nesse processo, as selectinas presentes na rolagem; quimiocinas ligadas aos proteoglicanos nos neutrófilos ativados para aumentar a avidez das integrinas; integrinas em firme adesão e CD31 (PECAM-1) na transmigração
 Fonte: PERKINS *et al.*, 2010; KUMAR *et al.*, 2013

Embora a resposta inflamatória seja benéfica ao hospedeiro, as falhas na remoção do estímulo antigênico pelos neutrófilos por meio da fagocitose, na eliminação das células inflamatórias apoptóticas, ou na própria apoptose, resultam na persistência da inflamação, que conduz a uma cronicidade do processo ou a perda da função do órgão, quando ocorre fibrose tecidual (Figura 2) (KUMAR *et al.*, 2013; ROGERIO *et al.*, 2015).

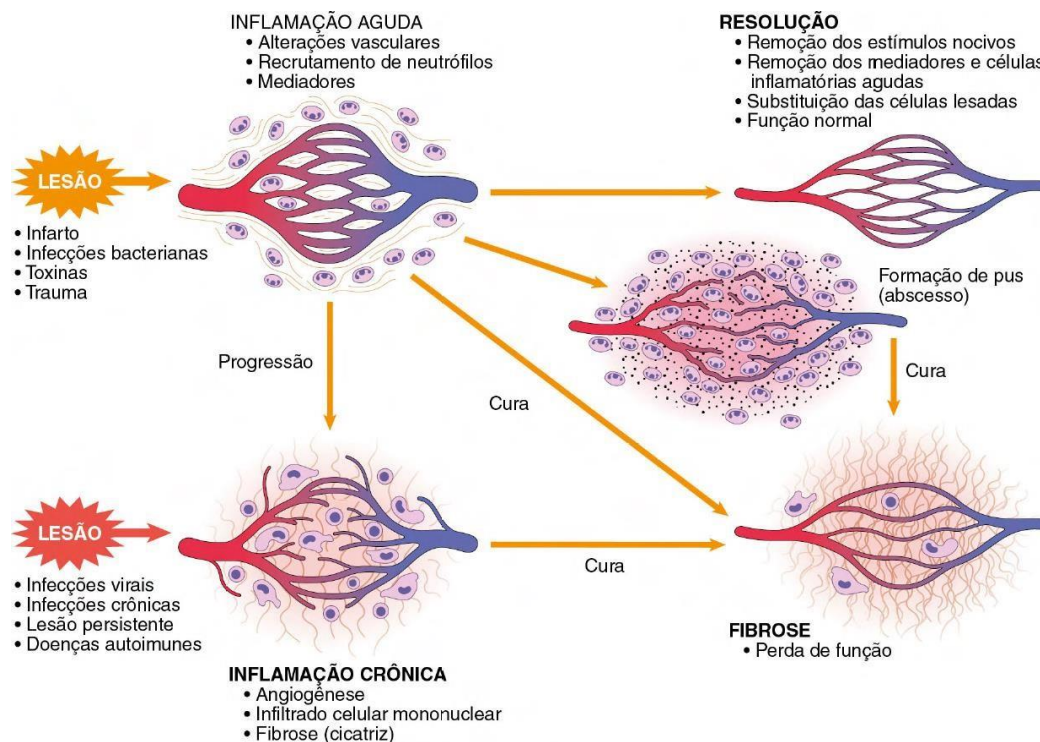


Figura 2 - Mecanismos associados à inflamação aguda e sua resolução, além da perda de função por fibrose e inflamação crônica

Fonte: KUMAR et al., 2013

1.1.2. Inflamação Crônica

A inflamação crônica é o processo que ocorre posteriormente a uma inflamação aguda, quando a infecção não foi totalmente eliminada ou a lesão do tecido é prolongada. Geralmente envolve o recrutamento e a ativação de macrófagos e linfócitos e muitas vezes também a remodelação do tecido no local da inflamação, através da angiogênese (proliferação de vasos sanguíneos) e fibrose (substituição do parênquima por tecido conjuntivo rico em fibroblasto). Embora estímulos da imunidade inata possam contribuir para a inflamação crônica, o sistema imunitário adaptativo pode também estar envolvido por meio da produção de citocinas pelas células T, que são fortes indutores de inflamação (LUNDEVIG *et al.*, 2012).

A inflamação prolongada cessa o efeito benéfico da inflamação, não é autolimitada, e contribui para a patogênese de muitas doenças, caracterizando-se pelo acúmulo de células inflamatórias e, por conseguinte, a perda da função do órgão e do tecido. Como resultado de uma resposta inapropriada, temos o desenvolvimento de várias desordens patológicas como artrite reumatoide, bronquite crônica, asma, enfisema, glomerulonefrites, infarto do miocárdio, aterosclerose, doença de Alzheimer e câncer (LAWRENCE *et al.*; 2002; PYEE, 2014).

A inflamação crônica pode ocorrer por diferentes estímulos que incluem, a infecção por micro-organismos, que são difíceis de erradicar, e as doenças autoimunes, que são causadas por uma excessiva e inapropriada ativação do sistema imune e prolongada exposição a agentes potencialmente tóxicos, endógenos (por exemplo componentes lipídicos tóxicos no plasma, que causam a aterosclerose) e exógenos (como a inalação de partículas de sílica por longos períodos) (PERKINS *et al.*, 2010; KUMAR *et al.*, 2013).

Além desses fatores, a produção de mediadores pró-inflamatórios continuamente, a infiltração de monócitos no tecido inflamado e fatores genéticos e ambientais, também conduzem a danos nos tecidos. Os tecidos danificados e os macrófagos necróticos que não foram eliminados pela resposta imunitária do hospedeiro, podem desencadear ou amplificar a resposta inflamatória e por consequência ativar a resposta imune adaptativa, cronificando o processo inflamatório (FICHTNER-FEIGL *et al.*, 2008; KENNEDY *et al.*, 2009; REDDY *et al.*, 2009).

Outra característica da inflamação crônica é a renovação celular constante, o que por sua vez, leva à aceleração da divisão celular e um aumento do risco de mutação e transformação neoplásica. Com a infecção persistente induzindo a inflamação crônica, os produtos gerados pelos leucócitos e outras células, incluindo os leucotrienos e as espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, acabam causando danos ao DNA. As células inflamatórias também liberam as prostaglandinas produzidas pela ação da enzima ciclo-oxigenase 2 (COX-2), o que intensifica a inflamação e tem um impacto sobre várias vias neoplásicas (ADEFUYE *et al.*, 2012).

Neste cenário, a resolução prematura dessa inflamação desregulada ou persistente representa um processo que, se segmentado, poderia proporcionar novas estratégias terapêuticas para o tratamento de uma grande variedade de doenças (HEADLAND E NORLING, 2015).

1.2. Mediadores da inflamação

O processo inflamatório clássico resulta na liberação de vários mediadores inflamatórios que auxiliam no recrutamento de neutrófilos e de proteínas plasmáticas ao local da inflamação por meio da indução da vasodilatação e de fatores quimiotáticos produzidos pelos neutrófilos circulantes (ROCK *et al.*, 2010; MÓCSAI *et al.*, 2015).

A resolução da inflamação e o retorno da homeostase, não é um processo simples passivo, mas sim um processo bioquímico ativo, altamente regulado que é atualmente considerado uma resolução programada no tecido. Nesse contexto, mediadores da resposta imune especializados compreendem um gênero de moléculas endógenas, as quais direcionam ativamente o término da inflamação. Esses mediadores desencadeiam vias que sinalizam uma fase aguda fisiológica (LEVY *et al.*, 2001).

Células pró-inflamatórias, principalmente as mediadas por macrófagos ativados, medeiam a maior parte da fisiopatologia celular e molecular da inflamação através da produção de citocinas e outras moléculas pró-inflamatórias, incluindo enzimas hidrolíticas, prostaglandinas e radicais livres, como o óxido nítrico (LASKIN *et al.*, 1995).

1.2.1. Óxido Nítrico (NO)

O NO é uma importante molécula sinalizadora intracelular e intercelular envolvida na regulação de vários mecanismos fisiopatológicos nos sistemas cardiovascular, nervoso e imunológico, apresentando papéis contrastantes em organismos vivos. Ele atua como um mediador biológico semelhante a neurotransmissores no sistema neuronal, pode regular os tónus dos vasos sanguíneos no sistema vascular e é fundamental para o sistema imunológico do hospedeiro. Por outro lado, é um radical livre de oxigênio que pode funcionar como um agente citotóxico em processos patológicos, particularmente nas doenças inflamatórias (AKTAN *et al.*, 2004; ALDERTON *et al.*, 2001; MONCADA E HIGGS *et al.*, 1991).

Além disso, o NO difunde nos tecidos e é capaz de atravessar membranas celulares livremente. Em altas concentrações e em condições aeróbicas, é rapidamente oxidado a espécies reativas de oxigênio (ROS), sendo o N_2O_3 o principal produto oxidativo. Como as ROS são instáveis, rapidamente são nitrosadas a tióis ou aminas, ou são hidrolisados e excretados como nitritos (NO_2^-). O NO é responsável por efeitos biológicos diversos, como a toxicidade celular sobre patógenos (COLEMAN, 2001).

A óxido nítrico sintases (NOS) são enzimas responsáveis por catalisar a conversão da L-arginina em L-citrulina e óxido nítrico (NO), que é um radical livre envolvido em funções imunológicas e homeostáticas. Existem três isoformas de NOS e cada uma está associada a um conjunto de características e expressões padrões, as quais são usadas para definir a nomenclatura de cada isoforma. NOS 1 é frequentemente denominada nNOS, por causa da sua expressão em neurônios e no cérebro. NOS 2 refere-se a iNOS, devido sua expressão ser induzida por ativação celular e NOS3 geralmente é referida a eNOS por causa da sua associação com o endotélio (MATTILA *et al.*, 2014).

Estímulos inflamatórios, como o lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), desencadeiam a produção de NO e regula a expressão de iNOS em macrófagos através das vias de sinalização MAPKs e NF- κ B (MANCINO *et al.*, 2010). A inibição da produção de NO é uma chave essencial anti-inflamatória sendo considerada uma estratégia no desenvolvimento de drogas (KORHONEN *et al.*, 2005).

1.2.2. Metabólitos do ácido araquidônico

No momento em que as células são ativadas em resposta a uma variedade de estímulos (físicos, químicos, microbianos ou por mediadores da inflamação como citocinas), o ácido araquidônico é liberado da membrana fosfolipídica por meio da atuação de enzimas fosfolipases secretadas de forma rápida para produzir prostaglandinas e leucotrienos, que são mediadores lipídicos sinalizadores intra ou extracelulares em processos biológicos como inflamação e homeostasia (KUMAR *et al.*, 2013; SIVAMANI *et al.*, 2014).

O ácido araquidônico é um precursor endógeno comum na biossíntese de eicosanoides, é rapidamente convertido a vários mediadores potentes lipídicos como por ciclooxigenases, lipooxigenases e epoxigenases para produzir prostaglandinas, leucotrienos, e endoperóxidos, respectivamente. Os mediadores lipídicos produzidos localmente tais como as prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos atuam como autacóides (moléculas de vida curta que sinalizam no local da síntese ou em local imediatamente adjacente) (FREIRE e VAN-DYKE *et al.*, 2013).

A via das ciclooxigenases é composta por dois tipos de enzimas: COX-1, que é constitutivamente expressa por uma variedade de células e tecidos, responsável pelos níveis basais da síntese de prostaglandina e a COX-2 que é o produto de um gene de resposta precoce imediata em células inflamatórias. A expressão de COX-2 é induzida por endotoxinas, por citocinas como IL-1 e TNF- α (GDEK-MICHALSKA *et al.*, 2013) e fatores de crescimento, é

predominantemente encontrada no cérebro, rim, e células endoteliais e é regulada positivamente de forma significativa, como parte de várias condições inflamatórias agudas e crônicas (CAMARA-LEMARROY *et al.*, 2012).

As prostaglandinas são produtos da via das ciclooxigenases (COX) do metabolismo do ácido araquidônico. São divididas em dez subclasses das quais D, E, F, G, H e I são as mais importantes na inflamação. Especificamente, a prostaglandina E₂ é gerada via prostaglandina sintase E em leucócitos, enquanto que a prostaglandina I₂ é gerada pela via da prostaciclina sintase em células endoteliais, e tromboxanos, que são gerados pela via tromboxano sintase em plaquetas (FREIRE *et al.*, 2013).

A COX catalisa a conversão do ácido araquidônico a prostaglandina H₂, que é um precursor de mediadores com atividades biológicas como a prostaglandina E₂ (PGE₂) (DUBOIS *et al.*, 1998; SMITH, 1996 apud JEON *et al.*, 2012), uma das prostaglandinas mais abundantes produzidas pelo organismo, largamente caracterizada em espécies animais como mediadora importante na regulação da respostas imunes, pressão sanguínea, integridade gastrointestinal e fertilidade, a desregulação na síntese ou degradação da PGE₂, tem sido destacada em várias condições patológicas. Na inflamação a PGE₂ apresenta interesse particular por estar envolvida em todos os processos que levam aos sinais clássicos da inflamação (DUBOIS *et al.*, 1998).

As lipoxigenases catalisam a formação de ácidos hidroxieicosatetraenóicos do ácido araquidônico, levando a formação de leucotrienos e outros compostos biologicamente ativos. Os leucotrienos são predominantemente produzidos por células inflamatórias, incluindo leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e mastócitos. O leucotrieno B₄ é o principal envolvido no processo inflamatório, sendo um potente regulador da quimiotaxia dos neutrófilos e adesão dos leucócitos às células endoteliais (FUNK *et al.*, 2001; RICCIOTTI *et al.*, 2011) (Figura 3).

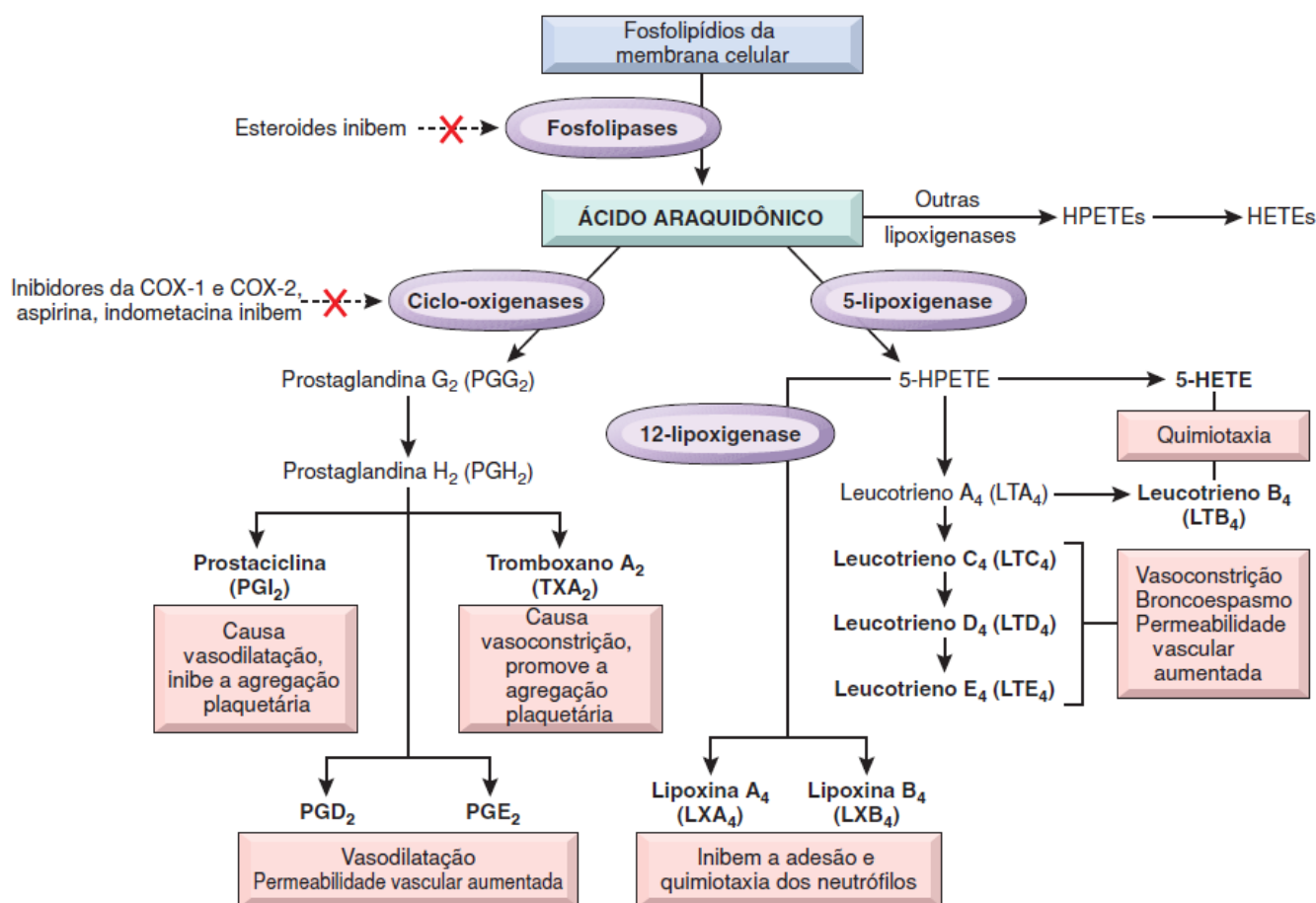


Figura 3 - Cascata de produção dos metabólitos do ácido araquidônico
 Fonte: KUMAR *et al.*, 2013

1.2.3. Citocinas

Citocinas e quimiocinas são proteínas de baixo peso molecular que sinalizam à comunicação intracelular e são produzidas por células que compõem o sistema imunitário. São moléculas de sinalização potentes fundamentais à vida, como os hormônios e os neurotransmissores (DINARELLO *et al.*, 2007). Também funcionam como mediadores da diferenciação celular, inflamação, doenças autoimunes e na regulação da resposta imunológica. Há uma necessidade de equilíbrio entre as citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias para o desenvolvimento de uma resposta imune efetora e bem regulada, pois o excesso da produção de citocinas pró-inflamatórias e/ou a deficiência de citocinas anti-inflamatórias pode gerar um desequilíbrio na resposta imunológica (ASTRY *et al.*, 2011; LENG *et al.*, 2011; CLAVEL *et al.*, 2013; GAFFEN *et al.*, 2014).

A principal função das citocinas é regular a inflamação, desempenhando também um papel vital na regulação da resposta imune. São principalmente produzidas por macrófagos e linfócitos, embora possam ser produzidas por leucócitos polimorfonucleares (PMN), células endoteliais e epiteliais, adipócitos e tecidos conjuntivos (DUQUE *et al.*, 2014).

1.2.3.1 Citocinas Pró-inflamatórias

São consideradas citocinas pró-inflamatórias: TNF- α , IL-1 (IL- α , IL-1 β e IL-1Ra), IL-6, IL-12, IL-18, IL-23 e IL-27, entretanto nesta seção abordaremos apenas as citocinas envolvidas no estudo. O fator de necrose tumoral alfa, inicialmente conhecido como TNF- α , é uma glicoproteína de 185 aminoácidos que foi primeiramente descrita pela capacidade de induzir necrose em tumores (CARSWELL *et al.*, 1975). TNF- α é uma das citocinas responsáveis pelo choque séptico. No hipotálamo, essa citocina estimula a liberação de hormônio adrenocorticotrófico, que inibe o apetite e induz a febre. No fígado estimula a resposta inflamatória pela elevação da síntese de proteína C reativa e outros mediadores. Esta citocina também induz a vasodilatação e perda da permeabilidade vascular, facilitando a infiltração de linfócitos, neutrófilos e monócitos (GRIFFIN *et al.*, 2012).

Como indutor de resposta inflamatória, o TNF- α desempenha vários papéis patológicos em doenças tais como a doença inflamatória do intestino, psoríase, artrite reumatoide, asma, câncer, doenças infecciosas e outras doenças autoimunes (SOZZANI *et al.*, 2014).

A interleucina 6 (IL-6) é uma glicoproteína constituída de 184 aminoácidos e peso molecular de 26 quilodaltons (kDa). É conhecida como citocina multifuncional que, além de suas funções como pró-inflamatória e agente esclerosante, também afeta a atividade das células neoplásicas (ARA *et al.*, 2010; GUO *et al.*, 2012; ZAROGOULIDIS *et al.*, 2013) e está implicada na Doença de Crohn (NISHIMOTO *et al.*, 2004) e artrite reumatóide (YOSHIDA *et al.*, 2014). É produzida principalmente por macrófagos e células dendríticas. IL-6 provoca a sinalização através da ligação ao receptor IL-6 (IL-6R), que é expresso em alguns leucócitos. Uma forma solúvel de IL-6R é apresentada no soro. O complexo de IL-6 e IL-6R, ou o complexo de IL-6 e IL-6R solúvel se liga a gp 130, que conduz à ativação da cascata de sinalização (CALABRESE *et al.*, 2014).

1.2.3.2 Citocinas anti-inflamatórias

Dentre as citocinas anti-inflamatórias podemos citar: A IL-4, IL-10 e TGF β , e nos limitaremos a discorrer apenas sobre a IL-10, que fará parte dos dados complementares deste trabalho.

A IL-10 é uma citocina com 35 kD identificada em 1989, e é produzida por macrófagos ativados, células B e células T (MOSSER *et al.*, 2008). É responsável por inibir a apresentação de antígenos e a liberação de citocinas pró-inflamatórias, atenuando assim, no processo inflamatório. É expressa por muitas células do sistema imune, sendo uma citocina anti-inflamatória chave produzida por macrófagos durante a fase proliferativa de reparação que facilita a remodelação do tecido (THOMPSON *et al.*, 2013; NOVAK E KOH, 2013).

IL-4 e IL-10 são capazes de regular negativamente mediadores inflamatórios, incluindo o TNF- α e IL-1 e favorecem uma resposta imune humoral (ROGY *et al.*, 2000), além de ser bastante efetiva para o tratamento de muitas doenças (DUQUE *et al.*, 2014).

1.3. Tratamento convencional e suas limitações

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) representam uma classe importante de compostos com aplicações terapêuticas que têm sido utilizados por vários séculos. Inicialmente, o fármaco que foi introduzido no mercado foi o ácido salicílico através da Bayer, em 1899 (VANE, 2000). Entretanto, os mecanismos de ação dos agentes anti-inflamatórios e analgésicos, como a aspirina e a indometacina, não estavam bem esclarecidos. Mais tarde, na década de 1970, John Vane descobriu o mecanismo de ação da aspirina, aumentando assim a capacidade de desenvolvimento de novos anti-inflamatórios não esteroidais (VANE, 1976), os mecanismos desses fármacos tinham ação na inibição da enzima prostaglandina H sintase ou na ciclooxigenase (COX), sendo aplicados em várias condições inflamatórias como artrite reumatóide e osteoartrite.

Nessas substâncias, foram observadas toxicidades gastrointestinais associada com o uso de AINES na COX-1, já a prostaglandinas pró-inflamatórias foram produzidas pela isoforma COX-2. Assim, os AINES tradicionais eram conhecidos por inibir ambas as isoformas de COX e suas toxicidades gastrointestinais adversas foram atribuídas à inibição das prostaglandinas (PGs) gastroprotetoras produzidas através da via da COX-1 (MONCADA *et al.*, 1973).

Pouco tempo depois, farmacêuticos conseguiram sintetizar inibidores seletivos da COX-2, com baixos efeitos adversos. No entanto, efeitos colaterais cardiovasculares associados com inibidores COX-2 seletivos foram destacados. Diante disso, novas abordagens estão sendo dirigidas para o desenvolvimento de inibidores de ciclooxigenase (COX) e lipoxigenases (LOX), como a utilização de anti-inflamatórios esteroidais (glicocorticoides) e terapia anti-TNF- α . Por mais que haja avanços na descoberta de drogas, o desenvolvimento de uma terapia segura, eficaz e econômica para o tratamento de doenças inflamatórias ainda representa um grande desafio (RAO *et al.*, 2008).

As doenças inflamatórias crônicas afetam muitas pessoas ao redor do mundo. O desenvolvimento de medicamentos anti-inflamatórios eficazes e seguros deve ser uma prioridade. No entanto, de acordo com a literatura disponível sobre o tema, são relatados vários efeitos adversos como úlceras, osteoporose, falência renal e aumento dos riscos de doenças cardiovasculares associados a drogas anti-inflamatórias não esteroidais convencionais (AINES) e inibidores seletivos da COX-2, limitando assim a aplicação em larga escala desses agentes. Assim, o desenvolvimento de compostos anti-inflamatórios mais recentes que possuam menos efeitos secundários ainda permanece um desafio para a comunidade científica (KUMAR *et al.*, 2008; RECIO *et al.*, 2012; RIBEIRO *et al.*, 2015). Por isso, a identificação de novas drogas que possam promover a resolução da inflamação e que sejam homeostáticas, modulatórias, eficientes e bem toleradas pelo organismo é de suma importância (DARSHAN E DORESWAMY, 2004).

1.4. Substâncias de origem vegetal como fonte de novos fármacos

As plantas foram as primeiras fontes de medicamentos na história da humanidade. Em todas as culturas, diferentes partes de um grande número de plantas foram utilizadas como medicamentos contra todos os tipos de doenças, apesar de seu uso ser baseado nas tradições orais e não em evidências na medicina, como nos dias de hoje. A consciência de que uma (ou mais) substância química dentro do material vegetal é responsável por ações farmacológicas, podendo ser isolada para o uso como agente único, surgiu no século XIX, no contexto da medicina baseada na ciência emergente natural e farmácia. Compostos derivados de plantas isoladas nesse período, como a morfina, quinina, colchicina, atropina, pilocarpina e teofilina são muito importantes e utilizados ainda na farmacoterapia atual (FÜRST E ZÜNDORF, 2014).

Estima-se que, mundialmente, cerca de 53.000 espécies de plantas têm sido utilizadas com finalidade medicinal (HAMILTON, 2004). A Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2011, relatou ainda que entre 70-95% das pessoas que vivem em países em desenvolvimento dependem principalmente de plantas medicinais para suas necessidades de cuidados primários de saúde (MALIK *et al.*, 2015).

No último século, diversas classes de produtos naturais que apresentam indicação terapêutica foram isoladas, suas estruturas caracterizadas e seus mecanismos bioquímicos e biológicos elucidados. Estas etapas são de grande relevância para a biossíntese e o desenvolvimento de drogas terapêuticas (BASSO *et al.*, 2005; NEWMAN *et al.*, 2000).

Neste cenário, as plantas medicinais asseguram uma posição de destaque como fonte de moléculas bioativas naturais (BASSO *et al.*, 2005). Além disso, a diversidade química das plantas faz delas fonte de escolha para o isolamento destas moléculas e/ou metabólitos farmacologicamente relevantes (CRAGG *et al.*, 1995). Aproximadamente 25% dos fármacos prescritos em todo o mundo têm origem nas plantas, e 11% dos 252 fármacos considerados essenciais pela Organização Mundial de Saúde (OMS) derivam exclusivamente de plantas medicinais (RATES, 2001). Em paradoxo, estima-se que no mundo existam cerca de 400.000 mil espécies de plantas, das quais apenas 10% foram caracterizadas quimicamente parcialmente, e dos 100.000 mil metabólitos secundários descobertos apenas metade talvez tenha sido totalmente elucidado (OKSMAN-CALDENTEY E INZÉ, 2004).

Como a diversidade de espécies de plantas não está uniformemente distribuída pelo planeta, estima-se que 70% das espécies de plantas do mundo ocorrem em 12 países: Austrália, Brasil, China, Colômbia, Equador, Índia, Indonésia, Madagascar, México, Peru e Zaire. Deste total de espécies de plantas, 50% estão localizadas nas florestas tropicais. No Brasil, há grandes áreas tropicais: a floresta tropical ou Atlântica (no litoral), o Cerrado (centro do país), a floresta Amazônica (no Norte), a floresta Araucária (no Sul) e a Caatinga (no interior do Nordeste), o que coloca o país numa posição de destaque no cenário da biodiversidade mundial (MYERS *et al.*, 2000), e estratégica para o desenvolvimento sustentável de novas drogas e/ou metabólitos com valor terapêutico (BASSO *et al.*, 2005).

As drogas anti-inflamatórias atuais têm apresentado várias limitações, como falta de resposta, efeitos adversos, problemas no custo de produção e entrega; portanto, é necessário encontrar-se novos agentes anti-inflamatórios, com farmacologia seletiva e perda da toxicidade. Extratos têm sido utilizados há séculos na medicina popular para aliviar doenças inflamatórias, no entanto, o conhecimento sobre os mecanismos de ação é ínfimo. O entendimento dos

mecanismos moleculares entre as propriedades dos produtos naturais é essencial para encontrar compostos que possam ser utilizados como modelo de novas moléculas com ação terapêutica (NEWMAN E CRAGG, 2007).

1.5. Atividades biológicas de plantas medicinais do Cerrado brasileiro

A região do Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro e abriga uma variedade de espécies de plantas (SOUZA *et al.*, 2012), que são conhecidas por apresentarem compostos de interesse biotecnológico, para aplicações na medicina e na indústria de alimentos (CARAMORI *et al.*, 2004). Várias plantas de famílias encontradas neste bioma, por exemplo, *Apocynaceae*, *Sapotaceae*, *Fabaceae*, entre outros, têm atividades biológicas como antimicrobianos, anti-inflamatórios e antifúngico, descritas em alguns trabalhos na literatura (SILVA *et al.*, 2009; SOUZA *et al.*, 2012).

A atividade anti-inflamatória das plantas do Cerrado pode estar associada à presença de triterpenos e flavonóides encontrados em plantas como as *Sapotaceae*, e suas espécies de *Pouteria* (SILVA *et al.*, 2009). Além destas, em outras plantas desse bioma, como as das famílias *Flacourtiaceae* (*Casearia sylvestris*) e *Sapindaceae* (*Cupania vernalis* e *Serjania lethalis*), foram comprovados em modelos *in vitro* atividade anti-inflamatória (NAPOLITANO *et al.*, 2005).

1.5.1. O gênero *Pouteria* (*Sapotaceae* Juss.)

A família *Sapotaceae* pertence a ordem das *Ericales* e ao filo angiosperma, é de morfologia variável, apresentando 53 gêneros e cerca de 1250 espécies já descritas, que se encontram distribuídas mundialmente (Figura 4), e com maior diversidade em regiões tropicais e subtropicais da Ásia e América do Sul (SWENSON E ANDBERG, 2005). No Brasil, segundo Carneiro *et al.* (2015), atualmente são registrados cerca de 12 gêneros, 232 espécies e 27 subespécies.

Muitas espécies da família *Sapotaceae* são conhecidas por apresentarem relevância econômica através de seus frutos, da produção de látex, madeira e derivados (PENNINGTON, 1991), e também pelo seu potencial medicinal (SILVA *et al.*, 2009). Dentre os principais gêneros presentes nesta família, destaca-se *Pouteria* Albl. com aproximadamente 330 espécies distribuídas em grande parte pelos Neotrópicos (PENNINGTON, 1991), sendo registradas no

Brasil, atualmente, cerca de 122 espécies, dessas, 50 são endêmicas e outras oito subespécies (ALVES-ARAÚJO, 2015). Além disso, no Brasil, esse gênero encontra-se disperso principalmente na Amazônia e região costeira e com frequência na Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo (PENNINGTON, 1991).



Figura 4 - Distribuição geográfica do gênero *Pouteria*, destacado em vermelho
Fonte: PEILER *et al.*, 2004

Pouteria é um gênero de árvores frutíferas tropicais, no qual seus frutos apresentam a polpa amarela com uma a quatro sementes duras. Os frutos podem ser consumidos frescos ou depois de cozidos, podendo ser também utilizados na fabricação de cremes, sorvetes, batidas, doces e geleias. Foi relatada que espécies de *Pouteria* possuem muitos antioxidantes polifenólicos biologicamente ativos, que incluem o ácido gálico, galocatequina, catequina, epicatequina, dihidromiricetina e miricetina (MA *et al.*, 2004). As folhas de algumas espécies também reportaram potencial anti-inflamatório e na literatura é demonstrada também os efeitos protetores dos extratos de frutas em danos induzidos ao fígado pelo paracetamol, contudo, estudos aprofundados ainda precisam ser realizados (ASEERVATHAM *et al.*, 2014).

As espécies de *Pouteria* têm sido utilizadas como plantas medicinais por apresentarem grande potencial no tratamento de inflamações, febres, erupções de pele, úlceras e ainda efeitos larvicidas e antiradicalar (MA *et al.*, 2004; MONTENEGRO *et al.*, 2006).

Possuem triterpenos e flavonóides como principais metabólitos secundários (SILVA *et al.*, 2009). Um fitocomponente também isolado de várias espécies é o Lupeol, um triterpeno natural que tem apresentado grandes propriedades farmacológicas como agentes anti-inflamatórios, anti-artrite, antimutagênico e antitumorais (AGARWAL E RANGARI, 2003).

Segundo Silva (2007), os dados acerca da atividade farmacológica, bem como dos metabólitos secundários do gênero *Pouteria*, são limitados. Todavia, as atividades antimicrobiana, citotóxica e imunomoduladora têm sido evidenciadas.

No presente trabalho, estudamos duas espécies deste gênero, *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk. e *Pouteria torta* (Mart.) Radlk, as quais estão amplamente distribuídas no Brasil onde são encontradas nos domínios fitogeográficos Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica (ALVES-ARAUJO, 2015).

A espécie *Pouteria ramiflora* (Figura 5), é uma árvore com cerca de 10m de altura presente no centro e no Sul do Brasil e estende-se para o norte da Amazônia e a oeste para a Bolívia, com registro no Paraguai (PENNINGTON, 1991). É muito comum no Cerrado brasileiro, estando presente nas fisionomias de cerradão, cerrado sentido restrito, cerrado ralo, borda de vereda e mata mesofítica (ALMEIDA *et al.*, 1998). Foram coletadas no estado da Bahia, flores de abril a dezembro, e frutos, de setembro a fevereiro, em áreas de campo rupestre, cerrados e matas de galeria. Tem como nomes populares “louco” e “massaranduba” (QUEIROZ E CARNEIRO, 2011) na Bahia, fruta-do-veado e pessegueiro-do-cerrado em Minas gerais, maçaranduba e pitomba-do-leite no Piauí, e abiú-culite no Pará (ALVES-ARAUJO, 2015).

Costa *et al.* (2014) identificou em seu estudo a partir de extratos hidroalcoólicos a presença dos compostos fenólicos miricetina-3-*O*- β -D-galactopiranosídeo e miricetina-3-*O*- α -L-ramnopiranosídeo na concentração de 13,55 mg/g e 9,61 mg/g, respectivamente, bem como também um total de 125,87 mg/g de fenóis e 48,82 mg/g de flavonoides.

Em um ensaio com o extrato etanólico nas concentrações de 50 e 100 mg/Kg de *P. ramiflora*, foi evidenciado o efeito anti-inflamatório e analgésico em camundongos (FONTES-JUNIOR *et al.*, 2009).

Estudos em camundongo, demonstraram que a *Pouteria ramiflora* potencializou a atividade de enzimas antioxidantes e a diminuição de espécies oxidantes em animais diabéticos. O extrato da planta conferiu efeito neuroprotetor, entretanto estudos futuros são necessários para comprovar tal mecanismo de ação em diferentes fases do diabetes (COSTA *et al.*, 2013).

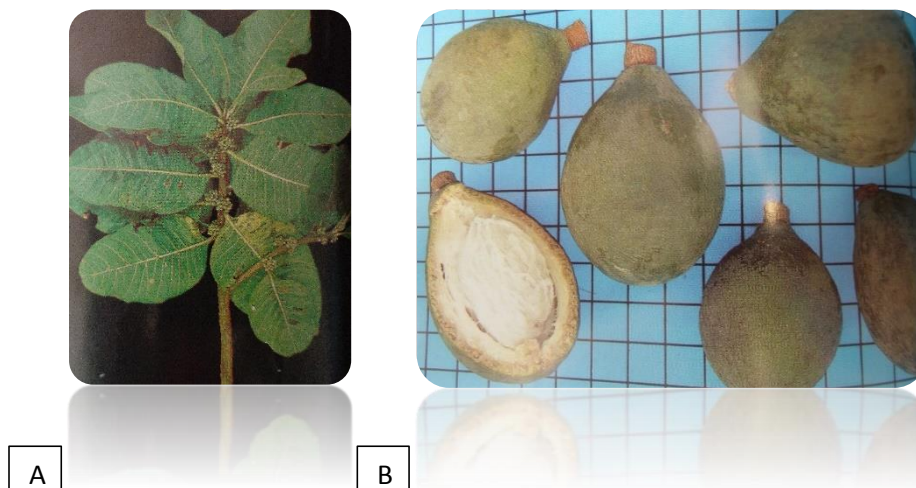


Figura 5 - *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk, (A) Folhas e (B) frutos.
Fonte: LORENZI *et al.*, 2006.

A *Pouteria torta* (Figura 6), popularmente conhecida como “guapeva”, “curiola”, “acá ferro”, “abiú do cerrado” e “grão de galo”, é uma árvore com ciclo de vida longo, podendo medir entre 8 a 14 m de altura e está presente no Cerrado brasileiro, mas também pode ser encontrada da região amazônica ao estado da Bahia. Pessoas da região utilizam os frutos amarelos na alimentação e a casca da árvore como antidiarreico (PERFEITO *et al.*, 2005; LORENZI, 1992). Sua distribuição ocorre no México, América Central, e Paraguai, na América do Sul (PENNINGTON, 1991). No Brasil, pode ser encontrada em florestas semidecíduas, pluviais e no Cerrado, e distribuída desde a região amazônica até o Goiás, Rio de Janeiro, Minas Gerais, São Paulo, Bahia e Paraná (LORENZI, 1992). Estudos na Bahia demonstraram que a espécie abrange a região do cerrado, florescendo entre fevereiro a dezembro e frutificando de maio a janeiro (QUEIROZ E CARNEIRO, 2011).

Extratos hexânicos e diclorometânico das flores e frutos de *Pouteria torta* apresentaram α e β -amirina (sendo que essa também foi isolada de folhas). Além disso, lupeol, taraxasterol, pseudotaraxasterol, cicloartenol, lanosterol, lanosta-7,24-dien e palmitato de eritrodiol. Ácidos graxos, triglicerídeos e hidrocarbonetos de cadeia normal e ramificada também foram isolados desses extratos (DAVID, 1993; SILVA *et al.*, 2009), ainda dessa espécie, destaca-se o isolamento dos ácidos betulínico e ursólico através do extrato metanólico (CHE *et al.*, 1980).

Três flavonoides foram identificados e isolados de *P. torta*, sendo duas do extrato metanólico: miricetina-3-*O*- β -D-galactopiranosídeo, miricetina-3-*O*- α -L-arabinopiranosídeo e miricetina-3-*O*- α -L-ramnopiranosídeo de extratos hexânicos (PERFEITO *et al.*, 2005).

Além disso, foi demonstrado também a presença de derivados de glicosídeos nos extratos de folhas *P. torta*. Estes metabólitos secundários são flavonóis, a subclasse mais abundante dos flavonóides (COSTA *et al.*, 2014).

Já uma proteína isolada de sementes de *Pouteria torta*, a pouteri, que apresenta atividade semelhante a lecitina, demonstrou atividade antifúngica pela inibição do crescimento de alguns fungos, através da interação da espécie com componentes presentes na parede celular fúngica como mananas, quitinas e outros sacarídeos. Apontou também atividade inseticida e foi responsável por induzir a aglutinação de eritrócitos de humanos, coelhos e ratos, ainda demonstrando notável atividade indutora da apoptose em células de mamíferos (BOLETI *et al.*, 2007; BOLETI *et al.*, 2008).

Apesar de sua importância e de alguns autores terem realizados estudos revisando a família *Sapotaceae* e o gênero *Pouteria* spp. no Brasil, há a necessidade de novos estudos sobre a caracterização da composição química e biológica dessas espécies, devido a morfologia complexa apresentada por muitas espécies e a falta de especialistas na área, impossibilitando muitas vezes sua interpretação (SILVA *et al.*, 2009).

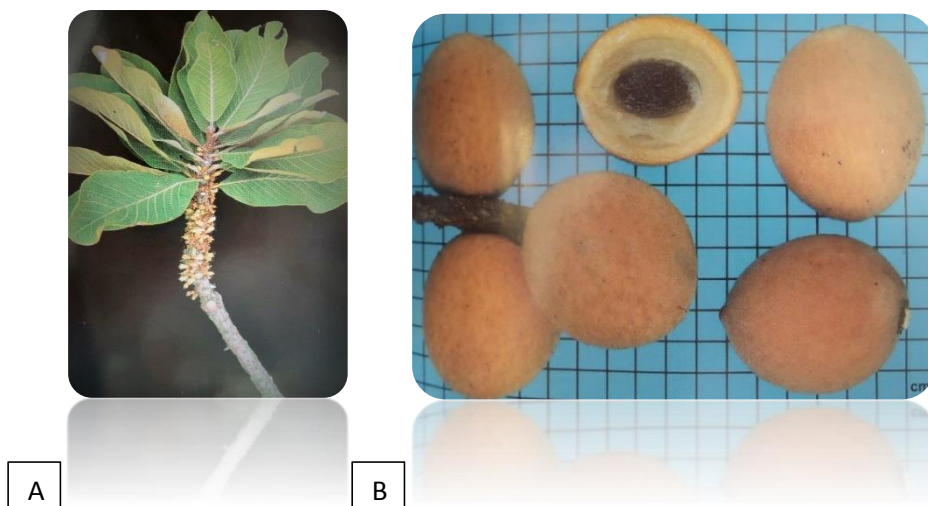


Figura 6 - *Pouteria torta* (Mart.) Radlk, (A) folhas e (B) frutos
Fonte: LORENZI *et al.*, 2006.

A existência de poucas publicações científicas para a maioria das atividades biológicas descritas para espécies de *Pouteria* (SILVA *et al.*, 2009) complementam a finalidade deste estudo, no que tange ao preenchimento dessa lacuna e possibilita novos conhecimentos sobre estas plantas do Cerrado brasileiro.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar o potencial anti-inflamatório de extratos de plantas das espécies *Pouteria torta* e *Pouteria ramiflora* em modelo celular inflamatório *in vitro*.

2.2. Objetivos Específicos

Verificar a modulação da expressão gênica de marcadores inflamatórios (*NFkb*, *Tnfa*, *IL-6*, *iNOS* e *COX-2*), na presença dos extratos de plantas utilizados no estudo.

Confirmar o potencial anti-inflamatório e antioxidante dos extratos de plantas estudados através da produção de óxido nítrico (NO), prostaglandina (PGE2) e Glutathione (GSH).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Material botânico

Os extratos vegetais utilizados foram fornecidos pelo Laboratório de Produtos Naturais, da Faculdade de Ciências da Saúde, da Universidade de Brasília (UnB). As plantas são provenientes da região do Cerrado e entorno de Brasília, e foram identificadas pelos botânicos Suelí Maria Gomes e Christopher William Fagg. *Vouchers* das espécies foram depositados no Herbário da UnB (Tabela 1).

Tabela 1 – Lista de espécies de plantas utilizadas no estudo

Espécies de plantas	Nome popular	Família	Vouchers
<i>Pouteria ramiflora</i> (Mart.)Radlk	“Fruta-do-veado”, “pessegueiro-do-cerrado”, “louco”, “massaranduba”, “pitomba-de-leite” ou “abiu-cutite”	Sapotaceae	(UB) 3671
<i>Pouteria torta</i> (Mart.)Radlk	“Guapeva” ou “grão de galo”	Sapotaceae	(UB) 3674

3.2. Extração botânica

Para obtenção do extrato, o material botânico foi seco em estufa com circulação de ar a temperatura inferior a 40°C, e, em seguida, submetido à moagem através de moinhos de facas. O pó obtido foi macerado com etanol 95° e água destilada, posteriormente a solução resultante foi concentrada em evaporador rotatório sob temperatura inferior a 40°C (CORREIA *et al.*, 2008). Para os experimentos, 100 mg dos extratos etanólico e aquoso foram solubilizados com 1mL dos solventes específicos, obtendo as soluções estoques com concentração final de 100 mg/mL (Tabela 2). O etanol dos extratos etanólicos utilizados nos experimentos estavam em uma concentração menor que 1% para não interferir na capacidade de produção de citocinas.

Tabela 2 – Informações técnicas dos extratos das plantas testados

Código	Espécies de Plantas	Parte da Planta	Extrato	Peso do Extrato	Solvente	Volume do Solvente	Concentração
PT2	<i>Pouteria torta</i> (Mart.)Radlk	Folhas	Etanólico	0,1000g	Etanol (95°)	1mL	100 mg/mL
PR3	<i>Pouteria ramiflora</i> (Mart.)Radlk	Folhas	Aquoso	0,1000g	Água ultrapura estéril	1mL	100 mg/mL
PR4	<i>Pouteria ramiflora</i> (Mart.)Radlk	Folhas	Etanólico	0,1000g	Etanol (95°)	1mL	100 mg/mL

3.3. Linhagem celular

As células RAW 264.7 *American Type Culture Collection* (ATCC® TIB71™) foram originalmente identificadas a partir da ascite induzida por tumor formado após injeção do vírus da leucemia Abelson (A-MuLV) em camundongo macho. São células com características de macrófagos de crescimento aderente e que apresentam a capacidade de produzir óxido nítrico quando estimuladas com LPS. É um modelo *in vitro* excelente para a seleção de drogas anti-inflamatórias e subsequente avaliação de inibidores das vias de sinalização que levam a indução de enzimas inflamatórias e a produção de citocinas pró-inflamatórias (FENGYANG *et al.*, 2012).

3.4. Cultura de células

Para avaliar os efeitos dos extratos das plantas e a produção de mediadores inflamatórios foram utilizados macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 (ATCC) TIB-71 adquiridas do Banco de Células do Instituto Adolf Lutz.

As células foram mantidas em nitrogênio líquido (criopreservação) em solução de congelamento contendo 5% de Dimetilsulfóxido (DMSO) e 22% de Soro fetal bovino (SFB). Para os ensaios de estimulação *in vitro*, as células foram descongeladas em banho maria a 37°C por 2 minutos e foram transferidas para frasco de 75 cm² contendo meio *Eagle* Modificado por Dulbecco (DMEM), o qual era composto por glicose 4500 mg/L, 110 mg de Piruvato de Sódio e 2mM L-glutamina (Sigma-Aldrich, Life Science, USA). Esse meio ainda foi suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Gibco, Invitrogen), inativado por calor (56°C por 1h), 100U/mL de penicilina-estreptomicina (SIGMA-Aldrich), 1% aminoácidos não-essenciais

(SIGMA-Aldrich) e 25mM de HEPES (Ácido Etanosulfônico 4-2-Hidroetil Piperazina-1, Sigma-Aldrich), o qual foi denominado meio DMEM completo. Em seguida, as células foram armazenadas em estufa incubadora à temperatura de 37°C contendo 95% de ar e 5% de CO₂ até completa recuperação da linhagem celular, o meio foi trocado rotineiramente a cada 3 dias. Após atingir confluência superior a 90%, subcultivos foram realizados obedecendo a taxa de 1:3 recomendada.

A contagem global de células foi realizada na câmara de Neubauer para a contagem total do número de macrófagos RAW 264.7. Em todos os experimentos, as células foram cultivadas após o plaqueamento por 24 horas antes do tratamento.

3.5. Cinética de ativação da linhagem celular RAW 264.7

Como controle positivo da ativação dos macrófagos foi utilizado o lipopolissacarídeo de bactérias gram-negativas (LPS) (*Lipopolysaccharides from Escherichia coli* 055: B5) (Sigma-Aldrich®, Life sciences, St. Louis, EUA). Para definir a melhor concentração de LPS capaz de estimular as células, foi realizada uma curva com as concentrações de 0,25, 0,5 e 1 µg/mL nos tempos 24, 48 e 72 horas. Para este ensaio, as células foram cultivadas conforme descrito anteriormente e semeadas em microplacas de 12 poços em uma concentração de 4×10^5 por poço, por um período de 24 horas. Em seguida, o meio DMEM completo foi descartado, e adicionado DMEM com 5% de SFB para manter sob controle a taxa de crescimento celular. Após 24 horas, foi adicionado aos poços o LPS nas concentrações descritas anteriormente e incubadas a 37°C em estufa com 5% CO₂ por 24 horas. Como controle negativo, foram utilizadas células em cultura sem tratamento. Os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -20°C para análise da produção de óxido nítrico, e todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Após a análise destes resultados, para avaliarmos se o aumento da concentração celular melhorava a produção de óxido nítrico, foi realizada uma curva com diferentes concentrações de células. Células RAW 264.7 foram semeadas em placas de 12 poços nas concentrações 5×10^3 , 5×10^4 , 5×10^5 e 5×10^6 . Após 24 horas, foi adicionado LPS na concentração de 1 µg/mL e incubado a 37°C, logo após, nos tempos de 6, 12, 24, 48 e 72 horas, e os sobrenadantes de cada período foram coletados.

A seguir, demonstramos na figura 7, um esboço definido previamente para a realização dos experimentos.

3.6. Delineamento experimental

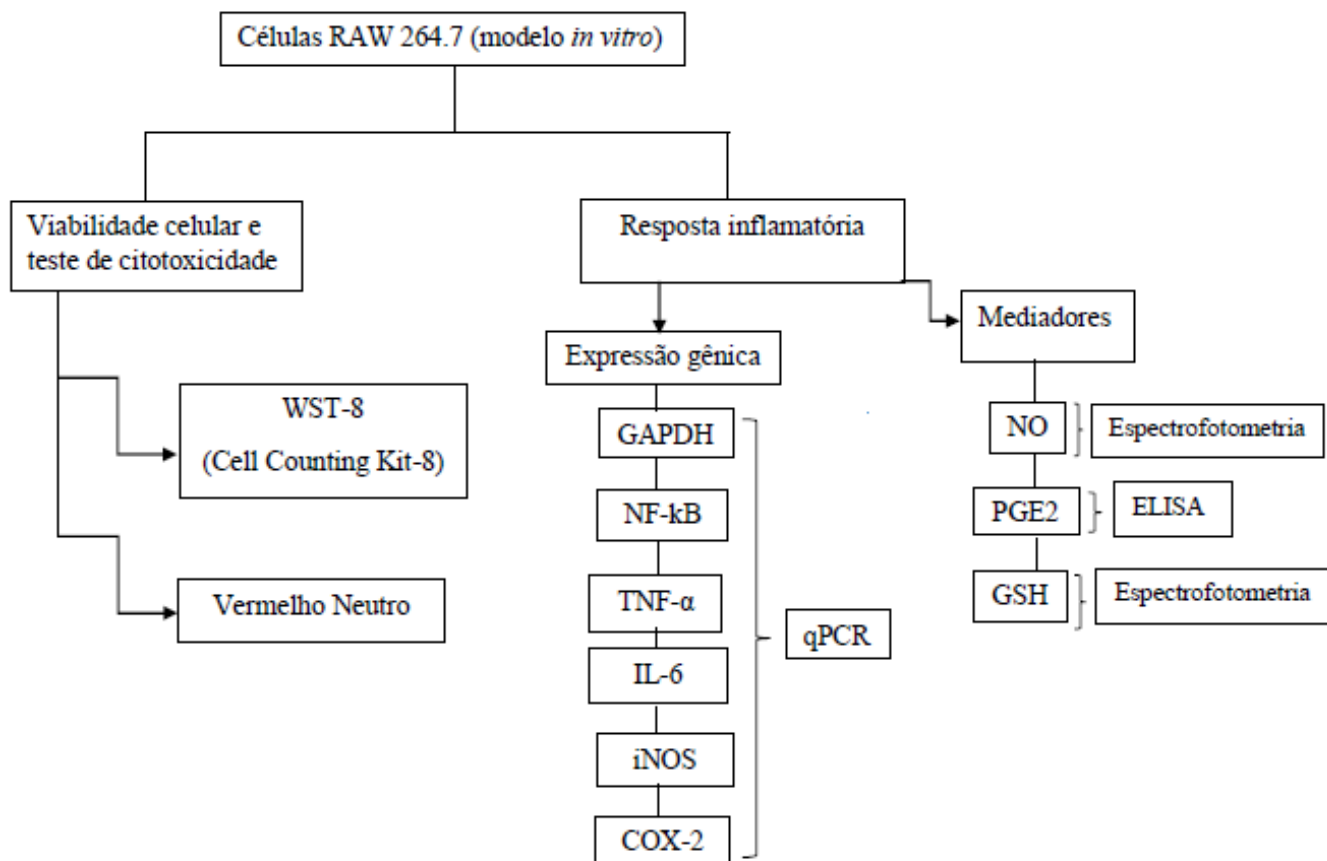


Figura 7 - Delineamento experimental desenvolvido durante o estudo.

3.7. Avaliação da viabilidade celular após interação com os extratos de plantas

3.7.1. Ensaio de WST-8

A citotoxicidade dos macrófagos tratados com os extratos foi determinada empregando-se o método WST-8 (*Cell Counting kit-8*) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, EUA), que é muito semelhante ao método colorimétrico 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)2,5-Difenil Brometo de Tetrazólio, *Methyl-Thiazolyl-Tetrazolium* (MTT).

O ensaio de MTT é baseado na capacidade da enzima mitocondrial desidrogenase presente somente em células viáveis, em clivar os anéis de tetrazólio de um reagente solúvel, o MTT o qual resulta na produção de cristais de formazan violeta, que são insolúveis em água e as membranas celulares e devem ser solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO). O ensaio de

WST-8 apresenta o mesmo princípio, mas emprega o sal monossódico de tetrazólio WST-8 [2-(2-metoxi-4-nitrofenil) -3- (4-nitrofenil) -5- (2,4-dissulfofenil) 2H-tetrazólio], que também produz cristais de formazan violeta, mas solúveis em água, não sendo necessário o emprego de DMSO para a dissolução dos cristais formados, o que torna o método mais sensível que o MTT e o XTT, comumente empregados. Em ambos os ensaios, o número de células sobreviventes é proporcional à quantidade de formazan e é representado pela cor da solução. A cor é quantificada em espectrofotômetro ou leitor de microplacas (JAFARAIN *et al.*, 2014).

Para a realização do ensaio de citotoxicidade celular, as células foram cultivadas em DMEM completo numa concentração de 1×10^5 em placas de 96 poços, incubados a 37°C em estufa com 5% CO₂ por um período de 24 horas. No dia seguinte, o meio foi trocado por 180 µL de meio DMEM suplementado com 5% de SFB com vermelho de fenol e foi adicionado 20µL de cada concentração do extrato testado. Os extratos de *Pouteria torta* e *Pouteria ramiflora* estavam em diferentes concentrações: 5, 2,5, 1,25, 0,625, 0,313, 0,156, 0,078 0,039, 0,020 mg/mL.

Depois da adição dos extratos, a cultura de células foi homogeneizada e a placa foi novamente incubada nas mesmas condições descritas. No terceiro dia, o meio foi descartado e acrescentado 100µL de meio DMEM incolor (sem a presença de vermelho de fenol) suplementado com 5% de SFB, e, em seguida, 10µL de WST-8 foi adicionado em cada poço. Nesse ensaio para o controle positivo, utilizamos células estimuladas com LPS e sem tratamento com os extratos. Para o controle de morte celular, usamos células estimuladas com LPS e tratadas com 10µL de Triton-X 1%. Para o branco, o meio DMEM incolor sem células. Após 4 horas de incubação com o WST-8, foi medida a absorbância das amostras em espectrofotômetro (Thermo Plate TP-Reader) utilizando filtro com comprimento de onda de 450 nm. Para descartar interação química entre o extrato e o reagente de WST-8, foi realizado um ensaio utilizando apenas WST-8 e cada uma das concentrações dos extratos testados, sem a presença de células.

3.7.2. Ensaio de Vermelho Neutro

O ensaio de incorporação do vermelho neutro é um teste que avalia a sobrevivência e viabilidade celular sendo baseada na capacidade das células viáveis incorporarem o vermelho neutro, um corante supravital, catiônico fraco que penetra facilmente nas membranas celulares por um mecanismo distinto da difusão, acumulando-se intracelularmente nos lisossomas, onde se liga aos sítios de matriz lisossomal aniônica. Alterações na superfície celular ou membrana do lisossoma leva a fragilidade lisossomal e outras mudanças que gradualmente tornam-se irreversíveis. Tais alterações causadas pela ação de xenobióticos resultam numa redução da absorção e ligação do vermelho neutro, portanto, é possível distinguir células mortas, danificadas, e vivas, que é a base deste teste (MATTANA *et al.*, 2014).

Para avaliar a viabilidade das células frente aos extratos, nos termos de integridade lisossomal, foi realizado o ensaio do vermelho neutro conforme descrito por Taner *et al.* (2013), com algumas modificações. As células foram colocadas em placa de 96 poços numa concentração de 1×10^5 , em meio DMEM completo e foram mantidas a 37°C com 5% de CO₂. Após 24 horas o meio foi substituído por 180µL de meio DMEM incolor contendo 5% de SFB, e 20 µL dos extratos (PT2, PR3 e PR4) nas concentrações: 5, 2,5, 1,25, 0,625, 0,313, 0,156, 0,078 0,039, 0,020 mg/mL. Em seguida, a placa foi novamente incubada por 48 horas nas mesmas condições supracitadas. Após 48 horas de incubação com o extrato, o meio foi aspirado e as células foram lavadas duas vezes com a solução tampão fosfato salino (PBS- pH 7.4) e 100 µL de meio DMEM completo e suplementado com 50 µg/mL de vermelho neutro foram adicionados aos poços. A placa foi incubada a 37°C com 5% de CO₂ por 3 horas, após esse período, o meio foi descartado e as células foram lavadas 5 vezes com PBS a fim de remover o excesso de corante não incorporado às células e 100 µL de solução de álcool-ácido (50% de etanol, 1% de ácido acético e 49% de água destilada) foram adicionadas em cada poço para fixar o vermelho neutro nas células. A placa foi agitada por 10 minutos e a absorbância de cada amostra foi lida em leitor de microplacas a 492nm. Os resultados foram expressos como uma porcentagem das células não tratadas, usando a equação:

$$\text{Viabilidade (\%)} = (\text{n}^\circ \text{ de células viáveis} / \text{número total de células}) \times 100.$$

Devido nossos resultados prévios terem demonstrado que os extratos das plantas foram citotóxicos, e além disso, interagiram quimicamente com os reagentes utilizados nas concentrações 5, 2,5, 1,25, 0,625, 0,313, 0,156 mg/mL, nós continuamos os ensaios

subsequentes apenas com as concentrações 0,078 0,039, 0,020 mg/mL, dos extratos PT2, PR3 e PR4 no tempo de 48 horas.

3.8. PCR em tempo real (qPCR)

3.8.1. Extração e purificação de RNA

Para a extração e purificação de RNA, foi utilizado o *Kit Direct-zol™ RNA Miniprep* (R2051, *Zymo Research*, USA) seguindo as recomendações do fabricante, que inclui etapa de tratamento com DNase. O método inicia com a extração pelo Trizol, que é constituído de uma solução monofásica de fenol e uma de isotiocianato de guanidina que rompe a célula mantendo a integridade do RNA total.

Para este ensaio, as células RAW 264.7 foram cultivadas na concentração de 7×10^5 em garrafas de 25cm^2 contendo meio DMEM 10% completo (com vermelho de fenol) até atingirem confluência de 90%. Após esse período, o meio foi descartado e adicionado 3 mL de meio DMEM incolor contendo 5% de SFB. Em seguida, as células foram tratadas com extrato nas diluições 0,156, 0,078, 0,039, 0,020 mg/mL e após 3 horas foi adicionado 30 μL de LPS. As células foram mantidas à temperatura de 37°C em atmosfera de 5% CO_2 por 48 horas. Após as 48 horas, o sobrenadante foi coletado e armazenados em microtubos de 1,5mL, que foram congelados a -20°C para posterior dosagem de citocinas. Em seguida, 1 mL de Trizol, *TRI Reagent®* (Sigma-aldrich, Life Science) foi adicionado ao tapete celular e, por pipetagem repetitiva, promoveu-se a lise celular. Em seguida, o lisado foi transferido para microtubos de 2 mL e armazenados a -20°C .

No dia seguinte, foi realizada a purificação do RNA por meio do *kit Direct-Zol™ RNA MiniPrep*. O lisado celular (1mL) em trizol foi descongelado por 5 minutos a temperatura ambiente para permitir a completa dissociação dos complexos de nucleoproteínas. Depois de descongelado, 1 mL do lisado celular foi transferido para novo microtubo e 1mL de etanol 95% filtrado foi adicionado, o conteúdo foi homogeneizado e agitado vigorosamente por 15 segundos, e, em seguida, transferido para a coluna de sílica, quando foi centrifugado a 11.000g por 1min. Em seguida, o filtrado foi descartado e a coluna transferida para tubo novo onde foi adicionado 400 μL de solução de lavagem (*RNA Wash Buffer*), e uma nova centrifugação foi realizada a 11.000g por 1min. A coluna foi então transferida para novo tubo para dar início a purificação do RNA.

Para o processo de purificação do RNA foi adicionado à coluna 80µL de DNase (*cocktel* DNase), aplicado diretamente no filtro, em seguida, os tubos e coluna foram incubados a 37°C em atmosfera de 5% CO₂ por 15 min e, após esse tempo, os tubos foram centrifugados a 11.000g por 30s. No passo seguinte, foi adicionada à coluna 400µL de solução pré-lavagem (RNA *pré-wash buffer*), e uma nova centrifugação foi realizada a 11.000g por 1 min. O filtrado foi descartado e esse passo novamente repetido. Posteriormente, foi adicionado à coluna 700µL de solução de lavagem (RNA *wash buffer*) e nova centrifugação a 11.000g por 2 minutos. O filtrado foi descartado e, em seguida, foi repetido a centrifugação com a coluna vazia na mesma velocidade e tempo. A coluna vazia foi transferida para novo microtubo livre de RNase e recebeu a adição de 22µL de água ultrapura (Invitrogen, *Life technologies*). Para a liberação do RNA purificado da coluna de sílica, uma nova centrifugação a 13.500g por 2 minutos foi realizada. O filtrado contendo RNA foi coletado e transferido para tubo de 1,5mL devidamente identificado para seguir com a quantificação do RNA.

3.8.2. Análise do RNA extraído

A qualidade do RNA extraído foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio (0,5µg/mL). A quantificação do RNA extraído foi determinada através de espectrofotômetro NANODROP ND-100 (Thermoscientific, Waltham, EUA). Para avaliar o grau de pureza das amostras foi considerada a razão da absorbância em dois comprimentos de onda nas densidades óticas (DO) A_{260/280} nm (que avalia contaminação com proteínas) e A_{260/230} nm (que avalia contaminação por compostos orgânicos), quando a razão dessas densidades óticas foi superior a 1.9, o grau de pureza do RNA foi considerado adequado para a realização das análises. Depois de quantificado em espectrofotômetro, o RNA total foi estocado à -80°C para posteriormente fazer a síntese do cDNA.

3.8.3. Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi realizada utilizando o kit *Highcapacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, USA) e as recomendações do fabricante seguidas na íntegra. Na maioria das amostras, quantidades de 2µg de RNA total foram submetidas à transcrição reversa (RT). Nas amostras com quantidade insuficiente, foi usado o volume

máximo de RNA mais água (9µL) por reação de RT, respeitando o volume total da reação de RT indicada pelo fabricante. Se ainda assim não fosse o suficiente, nova extração de RNA foi realizada para outra reação de RT. Não é indicada pelo fabricante a quantificação das amostras de cDNA após a reação de RT, sendo a quantidade de RNA colocado na reação igual a quantidade de cDNA obtida após a reação.

Após a síntese de cDNA, as amostras foram diluídas para a concentração final de 6ng/µL. Essa concentração foi estabelecida para padronizar o volume de cDNA para 6µL de amostra a ser pipetado para que cada reação de qPCR tenha 36ng/µL, tendo em vista o objetivo de diminuir ao máximo o erro de pipetagem, tornando possível a utilização de pipetador automático. Posteriormente, os microtubos contendo o cDNA foi armazenado em temperatura de - 20°C para futuras análises.

3.8.4. Definição dos genes de interesse para o estudo

Para esta etapa, selecionamos genes envolvidos com a atividade inflamatória, que melhor respondessem aos objetivos propostos no estudo. Foram utilizados 6 *primers* sintetizados pela *Integrated DNA Technologies* (IDT), descritos a seguir na Tabela 3. Todos os pares de *primers* foram desenhados utilizando o programa *Primer Express* (*Applied Biosystems*) com base nas sequências obtidas da base de dados do transcriptoma de camundongo (<http://www.informatics.jax.org>).

Tabela 3 – Genes de macrófagos RAW 264.7 analisados no estudo

Símbolo Gene alvo	Descrição	Pseudônimo
<i>GAPDH</i>	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	Gapdh
<i>COX-2</i>	Ciclooxigenase 2	-
<i>IL6</i>	Interleucina 6	IL-6
<i>iNOS</i>	Sintase induzida do óxido nítrico	Nos2 ou iNOS
<i>NFκB</i>	Fator Nuclear kappa B	NF-κB, NF-kappaB, NF-κB, p10 p50, p50/p105
<i>TNF-α</i>	Fator de Necrose Tumoral alfa	Tnf-α

3.8.5. Padronização das concentrações dos primers específicos

Os experimentos de qPCR foram realizados no equipamento StepOnePlus™ (*Applied BioSystems – Life Technologies™, Carlsbad, USA*). A otimização do protocolo de reação foi usada para determinar o desempenho da reação de PCR quando comparada com diferentes reações e condições. Para uma rigorosa avaliação, diversos fatores são levados em consideração e somados para se obter maior precisão e confiança nos resultados: 1) Precisão que é determinada e passível de ser corrigida quando a reação é feita em triplicata; 2) Eficiência, indicada pela inclinação (*slope*) da curva padrão e de outros parâmetros como R^2 e *Y-interceptor* (ponto em que a curva corta o eixo Y), esses são calculados pela diluição seriada, demonstrando o quão bom um valor é em prever outro valor, estabelecendo uma boa confiança na correlação de dois valores, e; 3) Sensibilidade da análise estatística, onde um grande número de replicatas é necessário para prover significância estatística.

Para otimizar o protocolo de reação de qPCR e a quantificação relativa pelo método $\Delta\Delta Ct$, dois experimentos foram necessários. O primeiro experimento é a Matriz dos *primers*, ou titulação. Nesse experimento diferentes concentrações dos *primers* são usadas com a mesma amostra de cDNA, sempre em triplicata. A concentração ideal é aquela que apresenta um maior rendimento, ou seja, menor valor de *threshold cycle* (Ct) e maior ΔRN . Ainda com a titulação, é possível identificar a presença ou não de dímeros de *primers* e a especificidade da reação, apresentando uma única curva de *melting*. O segundo experimento é o ensaio de eficiência da reação, onde é possível determinar se o protocolo de reação está bem otimizado em relação às concentrações dos componentes e também se os *primers* foram bem desenhados. Uma eficiência adequada para o conjunto de *primers* deve ficar em torno de 90-110%. Valores diferentes indicam problemas no experimento ou que os *primers* não são eficientes. A eficiência da reação garante que os resultados gerados serão precisos e confiáveis quando comparados a outros experimentos.

3.8.6. Titulação dos *Primer*

Inicialmente, as sequências dos *primers foward* e *reverse* dos genes *GAPDH*, *COX-2*, *IL-6*, *iNOS*, *NF-kB* e *TNF- α* foram obtidas, para expressão gênica pelo método $\Delta\Delta C_t$ por *SYBR Green* (Tabela 4).

Tabela 4 - Sequência dos *Primers* dos genes investigados por reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)

Símbolo Gene alvo	Sentido	Sequência (5'-3')	T _m *
<i>GAPDH</i>	<i>Foward</i>	5`-CCG GTG CTG AGT ATG TCG-3`	85,72
	<i>Reverse</i>	5`-CCC TGT TGC TGT AGC CGT A-3`	
<i>COX-2</i>	<i>Foward</i>	5`-TGA GTA CCG CAA ACG CTT CTC-3`	80,35
	<i>Reverse</i>	5`-TGG ACG AGG TTT TTC CAC CAG-3`	
<i>IL-6</i>	<i>Foward</i>	5`-GCT ACC AAA CTG GAT ATA ATC AGG A-3`	73,48
	<i>Reverse</i>	5`-CAG GTA GCTATGGTACTCCAGAA-3`	
<i>iNOS</i>	<i>Foward</i>	5`-GGC AGC CTG TGA GAC CTT TG-3`	77,81
	<i>Reverse</i>	5`-GCA TTG GAA GTG AAG CGT TTC-3`	
<i>NFκB</i>	<i>Foward</i>	5`-AGC CAG CTT CCG TGT TTG TT-3`	77,81
	<i>Reverse</i>	5`-AGG GTT TCG GTT CAC TAG TTT CC-3`	
<i>TNF-α</i>	<i>Foward</i>	5`-TCT TCT CAT TCC TGC TTG TGG-3`	81,7
	<i>Reverse</i>	5`-GGT CTG GGC CAT AGA ACT GA-3`	

*T_m= Temperatura média de anelamento em °C.

A concentração ideal de *primers* utilizadas na reação de qPCR deve ser a mínima necessária para a duplicação de todas as cópias do gene possíveis na amostra. Dessa forma, utilizando a mesma quantidade de amostras positivas de células estimuladas com LPS por 48 horas, foram feitas reações com a combinação de três diferentes concentrações de cada *primer* (*foward* e *reverse*), 100, 300 e 600 nM formando nove pares com concentrações distintas. As reações foram realizadas em triplicatas para cada gene. Foi utilizado o método de *Quantification – Relative Standard Curve*. A concentração ótima foi aquela em que o gene de interesse obteve o menor *crossing threshold* ou ciclo limiar (*Ct*) e ΔRN maior que 1, sem a formação de dímeros. Na tabela 5, estão listadas as condições ótimas padronizadas para cada um dos *primers* a partir do ensaio de otimização/titulação.

Tabela 5. *Threshold*, quantidades de *primers* e de cDNA e condições de termociclagem padronizadas para cada um dos *primers* a partir dos ensaios de curva padrão e otimização, para amplificação do qPCR.

Nome do gene	Threshold	Quantidade de primer (nM)	Quantidade de cDNA (ng)	Nº de ciclos de desnaturação
<i>GAPDH F</i>	2,22	300nM	100	40
<i>GAPDH R</i>	2,22	300 nM	100	40
<i>COX-2 F</i>	0,73	300 nM	100	40
<i>COX-2 R</i>	0,73	300 nM	100	40
<i>IL-6 F</i>	1,30	600 nM	100	40
<i>IL-6 R</i>	1,30	100 nM	100	40
<i>iNOS F</i>	1,02	300 nM	100	40
<i>iNOS R</i>	1,02	300 nM	100	40
<i>NF-κB F</i>	0,80	600 nM	100	40
<i>NF-κB R</i>	0,80	600 nM	100	40
<i>TNF-α F</i>	1,40	600 nM	100	40
<i>TNF-α R</i>	1,40	300 nM	100	40

3.8.7. Ensaio de eficiência

Estabelecida a melhor quantidade de *primer* por reação, realizamos o ensaio de eficiência. Para esse experimento foi necessário preparar grandes quantidades de cDNA de uma mesma amostra (células inflamadas com LPS, que apresenta expressão de todos os genes analisados), para ser diluída 1:2 em 6 pontos, em água ultrapura (Invitrogen, *Life technologies*), iniciando com 200ng, 100ng, 50ng, 25ng, 12,5ng e 25ng. Todas as reações foram feitas em triplicatas por gene e o método utilizado foi *Quantification – Relative Standard Curve* ou quantificação relativa.

3.8.8. Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em Tempo Real (qPCR)

A detecção da expressão gênica por qPCR foi feita pelo sistema *SYBR Green Máxima SYBR Green/Rox* qPCR (Thermo scientific, USA). Para cada reação de qPCR, foi utilizado 10µL de *SYBR Master Mix* (2x); 2µL de *primer forward* (5µM); 2µL de *primer reverse* (5µM);

6 μ L de cDNA (36ng) e quantidade suficiente de água ultrapura (Invitrogen, *Life technologies*) para completar 20 μ L de reação. Os ensaios de amplificação foram realizados em placas de 96 poços no *StepOnePlus Real-Time PCR System* (*Applied biosystems, USA*). A amplificação foi realizada a 95°C por 10 min, seguido de um estágio de 40 ciclos de 95°C por 15s, 60°C por 1 min e 72°C por 30s. As reações foram realizadas em triplicata para cada gene, sendo que o gene *GAPDH* foi utilizado como controle endógeno e os valores de *Ct* foram calculados usando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

3.8.9. Expressão gênica

Para a análise da expressão gênica dos transcritos que codificam os marcadores inflamatórios estudados, os dados de quantificação relativa (*Fold Change*) foram calculados pelo método $\Delta\Delta Ct$, que permite uma comparação relativa com o grupo que não recebeu tratamento ou grupo calibrador. Neste estudo, os calibradores foram o grupo 1, que não recebeu tratamento (NT), e o grupo 2, que foi estimulado com LPS (LPS).

Estes dados foram apresentados da seguinte forma: grupo calibrador 1 (G1), grupo calibrador 2 (G2), grupos G3 a G5 tratados com extrato de *Pouteria torta* (PT2) nas concentrações 0,078, 0,039 e 0,020 mg/mL, respectivamente, grupos G6 a G8 tratados com extrato de *Pouteria ramiflora* (PR3) nas concentrações 0,078, 0,039 e 0,020 mg/mL, respectivamente, e os Grupos G9 a G11 tratados com extrato de *Pouteria ramiflora* (PR4) nas concentrações 0,078, 0,039 e 0,020 mg/mL, respectivamente.

Grupo calibrador 1:

- **G2/G1** representa o número de vezes que o gene é mais (+) ou menos (-) expresso no Grupo 2 em relação ao Grupo 1, a fim de avaliarmos se o estímulo induzido com LPS altera a expressão dos genes em estudo.

- **G extratos (G3 a G11)/G1** representa o número de vezes que o gene é mais (+) ou menos (-) expresso nos Grupos extratos em relação ao Grupo 1, a fim de avaliarmos se os extratos utilizados alteram a expressão dos genes em estudo.

Grupo calibrador 2:

- **G extratos (G3 a G11) /G2** representa o número de vezes que o gene é mais (+) ou menos (-) expresso nos Grupos extratos em relação ao Grupo 2, a fim de avaliarmos se os

extratos utilizados no tratamento das células inflamadas com LPS alteram a expressão dos genes em estudo.

3.9. Dosagem de Óxido Nítrico (NO)

Para análise do NO, foi utilizado o método de Griess, pela adição de 100µL de reagente de Griess (1% [w/v] sulfanilamida em ácido fosfórico a 5% e 0,1% [w/v] de N-1-naftil-ethylendiamide-dicloridrato (NEED) em água). As amostras de sobrenadantes das culturas foram analisadas em leitora de microplacas (450nm), e os resultados expressos em µmol/L de NO₂⁻ comparando-se a densidade ótica (D.O.) obtida com uma curva padrão de NO₂⁻ variando de 3,125 a 200,0 µmol/L (GREEN *et al.*, 1981).

3.10. Dosagem de PGE2

A quantificação de prostaglandina E₂ foi realizada por meio do ensaio imunoenzimático de competição, conforme estabelecido no *kit* do fabricante (Cayman Chemical Company item no. 514010, Ann Arbor, MI, USA).

Para este ensaio, foram utilizados os sobrenadantes das células RAW 264.7 tratadas com os extratos PT2, PR3 e PR4 nas concentrações 0,078 0,039, 0,020 mg/mL.

A placa contida no *kit* para detecção de PGE2 estava pré-recoberta com o anticorpo policlonal anti-IgG de cabra e bloqueada com uma formulação própria de proteínas, para evitar reações inespecíficas. Após o preparo de todos os reagentes, 100 µL do *EIA buffer* foi adicionado nos poços *NSB* (ligante não específico) e 50 µL nos poços *B₀* (ligante máximo), em seguida 50 µL da curva padrão foi adicionada de acordo com cada concentração (padrões 1-8) em duplicata e em seguida 50 µL de cada amostra foi adicionado em triplicata nos respectivos poços, de acordo com cada concentração de extrato, iniciando pelos controles negativo (célula sem estímulo) e, em seguida, pelo positivo (células estimuladas com LPS). Na sequência, 50 µL da enzima acetilcolinesterase ligada a prostaglandina (*tracer*) foi adicionada aos poços com a única exceção dos TA (atividade total) e do Blk (branco) e, por último, 50 µL do anticorpo monoclonal de prostaglandina E₂ foi adicionado aos poços com exceção do TA, NSB e Blk. A placa foi coberta por plástico filme e incubada por 18 horas a 4°C. Após esse período, foi retirado o plástico filme e a placa foi direcionada para o equipamento BEST 2000 para o

processamento automatizado do ensaio. A placa foi inicialmente aspirada para remoção da solução de preparação inicial e, em seguida, foi lavada, por 5 vezes com o *Wash Buffer*. Após esse processo, foram pipetados 200 μL do reagente de Ellman's em todos os poços e 5 μL de *tracer* no TA. Posteriormente, a placa foi incubada sob agitação orbital com cobertura plana e ausência de luz, por 90 minutos. Finalmente, a leitura da placa foi realizada empregando um comprimento de onda de 405 nm.

O ensaio de PGE_2 é baseado na competição entre PGE_2 e a PGE_2 conjugada a acetilcolinesterase, a uma quantidade limitada de anticorpo monoclonal de PGE_2 . Como a concentração de PGE_2 conjugada é constante, e a da amostra de PGE_2 varia, a quantidade de PGE_2 conjugada é capaz de se ligar ao anticorpo monoclonal de PGE_2 , o qual é inversamente proporcional a concentração de PGE_2 na amostra pesquisada. Esse complexo entre o anticorpo- PGE_2 se liga ao anticorpo policlonal anti-IgG de cabra que previamente revestiu a placa. A placa então passa pelo processo de lavagem para remoção dos compostos não-ligados, é adicionado o reagente de Ellman's (substrato) aos poços. O produto final dessa reação enzimática apresenta uma cor amarela (CAYMAN, 2015).

A análise da intensidade dessa cor é determinada espectrofotometricamente e os resultados são avaliados de forma inversa à intensidade do sinal da absorbância obtido, ou seja, quanto maior for a concentração de PGE_2 na amostra testada, menor será a ligação de PGE_2 conjugada a acetilcolinesterase e menor será a absorbância, e vice-versa.

3.11. Ensaio da Glutaciona

Células RAW 264.7 foram semeadas numa concentração de 1×10^8 em placas de 6 poços por 24 horas. Em seguida, foram tratadas com os extratos PT2, PR3 e PR4 nas concentrações (0,078 e 0,039 mg/mL) e incubados a 37°C . Após 3 horas de tratamento foi adicionado $1 \mu\text{g/mL}$ de LPS e novamente transferido para a estufa e incubados a 37°C por 48 horas.

Após esse período, as células foram lavadas com PBS 1X pH 7,4 e depois ressuspensas numa densidade de 1×10^8 por mL e transferidas para um tubo de microcentrífuga. Em seguida, foram centrifugadas a 600g para a obtenção do *pellet* ou sedimento, e o sobrenadante foi descartado. O volume do *pellet* foi medido e adicionado de 3x volumes iguais de solução de ácido sulfosalicílico 5% ao *pellet* formado, e então foram agitados em agitador contínuo. A suspensão formada foi congelada em nitrogênio líquido e descongelada

em banho maria a 37°C, 2 vezes e depois foi mantida por 5 minutos a uma temperatura de 2-8°C para a lise das células. Em seguida, a suspensão celular foi centrifugada a 10.000g por 10 minutos e o sobrenadante foi quantificado em volume e reservado a uma temperatura de -20°C até a realização do ensaio. O valor do volume da amostra foi utilizado no cálculo de determinação da glutathiona.

O ensaio foi realizado utilizando o *Glutathione Assay Kit* (Sigma-Aldrich®, St. Louis, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Os testes foram realizados em duplicata, 10µL de Solução de ácido Sulfosalicílico (SSA) 5% foi empregado como branco, além de controles positivos e negativos, e dos padrões de calibração. Para a reação, inicialmente foi adicionado 10µL do sobrenadante anterior, bem como controle positivo e negativo, e calibradores padrões. Em seguida, 150µL da solução de trabalho, que é uma mistura de solução da enzima glutathiona redutase diluída em tampão fosfato de potássio (100mM, pH 7,0 com EDTA 1mM), com 1,5 mg/mL de ácido 5,5-Ditiobis (2-nitrobenzóico) DTNB, foi adicionada em cada poço. As amostras foram homogeneizadas e incubadas a temperatura ambiente por 5 minutos e, em seguida, 50µL da solução de Fosfato de Dinucleotídeo de Nicotina e Adenina ou Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (NADPH) a 0,16 mg/mL foi adicionada em cada poço. Após esse procedimento, a placa foi colocada em um leitor de microplacas a 412nm e a absorbância de cada poço foi medida, e calculada conforme a fórmula a seguir:

$$\text{Nmoles de GSH por mL de amostra} = \frac{\Delta A_{412}/\text{min (amostra)} \times \text{diluição}}{\Delta A_{412}/\text{min (1 nmole)} \times \text{volume}}$$

3.12. Análise estatística

A análise estatística foi realizada através da Análise de Variância (ANOVA), seguida pelo método pós-teste (Bonferoni, *Dunnett* e *t-teste*) quando aplicável, de acordo com o programa *GraphPad Prism* versão 4.0 (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, USA). Sendo consideradas diferenças estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação da cinética de ativação da linhagem celular RAW 264.7

No início do estudo foi realizada uma curva para avaliar a melhor concentração de LPS na estimulação das células RAW 264.7 em diferentes tempos de cultivo. Para cada tempo foram utilizadas as seguintes concentrações de LPS: 0,25, 0,5 e 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em cada poço, que foram analisadas através da produção de óxido nítrico pelas células.

Os resultados apresentados após o estímulo das células RAW 264.7 na concentração 4×10^5 com LPS mostraram uma maior produção de óxido nítrico (7,54 $\mu\text{mol}/\text{L}$) na concentração de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e no tempo de 48 horas (figura 8).

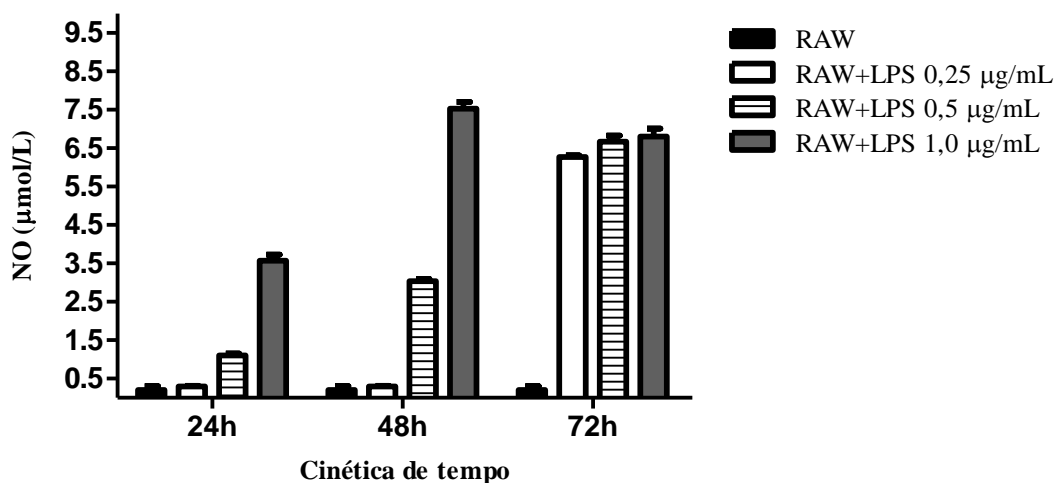


Figura 8 – Produção de óxido nítrico (NO) no sobrenadante da cultura de macrófagos RAW 264.7 estimulados com diferentes concentrações (0,25, 0,5 e 1,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de LPS

Os resultados de NO foram expressos em $\mu\text{mol}/\text{L}$ e representam a média \pm DP de três experimentos independentes

4.2. Avaliação de diferentes concentrações celulares numa cinética de ativação da linhagem celular RAW 264.7 com 1µg/mL de LPS

Para nos certificarmos que o estímulo estava adequado para a quantidade de células por poço utilizada no ensaio, e que a produção de óxido nítrico nestas células não era dependente do quantitativo de células no ensaio, foi realizado também uma curva de concentração de células estimuladas com 1µg/mL de LPS para avaliar qual a concentração celular que apresentava a melhor produção de óxido nítrico. As concentrações utilizadas foram: 5×10^3 , 5×10^4 , 5×10^5 e 5×10^6 , nos tempos 6, 18, 24, 48 e 72 horas em placas de 24 poços (dados não mostrados). De acordo com estes resultados, a maior produção de óxido nítrico foi obtida na concentração de 5×10^6 nos tempos de 48 horas ($8,66 \pm 1,01 \mu\text{mol/L}$) e 72 horas ($10,6 \pm 1,10 \mu\text{mol/L}$) que mostraram resultados de produção de NO compatíveis com o ensaio anterior, embora tenham demonstrado que um ajuste na concentração celular aumentou a produção de NO pelas células (figura 9).

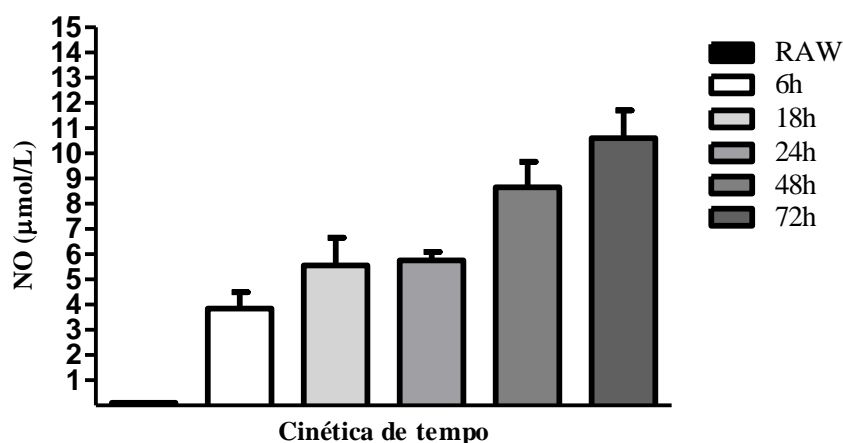


Figura 9 – Produção de óxido nítrico no sobrenadante de células Raw 264.7 numa concentração de 5×10^6 estimuladas com 1µg/mL de LPS nos tempos de 6, 18, 24, 48 e 72 horas. Os resultados de NO foram expressos em µmol/L e representam a média \pm DP de três experimentos independentes. NT (células não tratadas com LPS)

4.3. Ensaios para avaliação da viabilidade celular após interação com os extratos de plantas

4.3.1. Ensaio utilizando como reagente WST-8

4.3.1.1. Interação dos extratos das plantas com o reagente WST-8

Antes da interação dos extratos com as células RAW 264.7, foi realizado um ensaio de interação simples entre os extratos de plantas nas concentrações utilizadas com o reagente de WST-8 (*Cell Counting kit-8*), para avaliarmos se havia interação química nesta reação. Na análise do ensaio, consideramos que não ocorreu interação quando as concentrações de absorvância (D.O. em 450nm) foram inferiores ou igual ao branco do reagente de WST-8 utilizado. Neste caso, a absorvância do branco foi de 0,110 e as concentrações dos extratos que não apresentaram interferência do reagente foram 0,020, 0,039, 0,078 mg/mL para os três extratos de plantas testados, embora os dois extratos de *Pouteria ramiflora* (PR3 e PR4), também tenham apresentados ausência de interações na concentração de 0.156 mg/mL (figura 10).

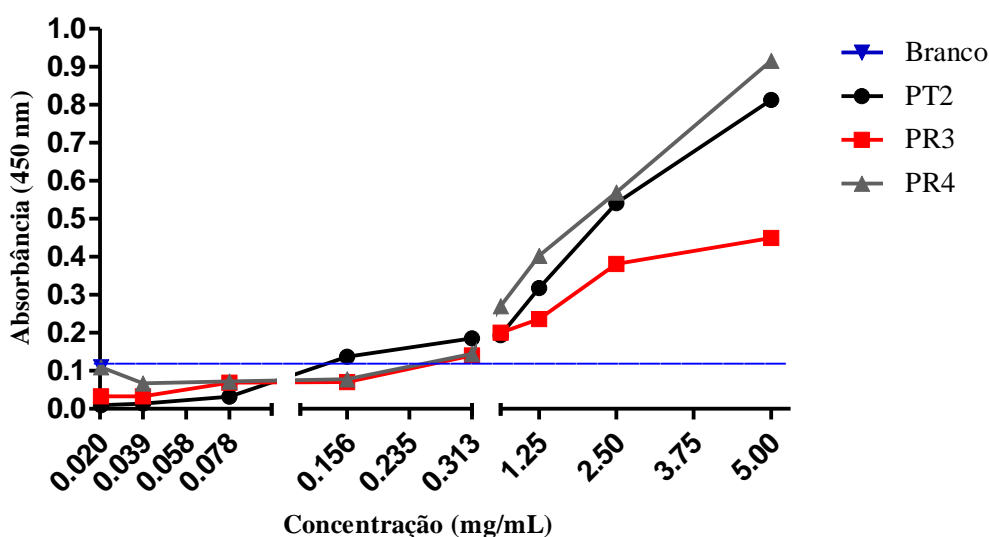


Figura 10 – Análise da interação química entre os extratos de *Pouteria torta* (PT2) e *Pouteria ramiflora* (PR3 e PR4) nas diferentes concentrações utilizadas e o reagente de WST-8 (*Cell Counting kit-8*)
Os resultados foram obtidos pela média \pm DP das triplicatas de três experimentos independentes

4.3.1.2. Efeito dos extratos das plantas sobre a viabilidade celular de RAW 264.7 pelo método de WST-8

Para avaliar se os extratos de *Pouteria* spp. eram tóxicos para as células, foram testadas diluições com as três concentrações diferentes dos extratos que não apresentaram interações químicas com o reagente de WST-8 isoladamente no ensaio anterior, e descontado conforme cálculo a densidade ótica do branco das amostras. Como os resultados obtidos demonstraram que as concentrações de 0,156, 0,313, 0,625, 1,25, 2,5 e 5 mg/mL (para o extrato PT2) e as concentrações 0,313, 0,625, 1,25, 2,5 e 5 mg/mL (para os extratos PR3 e PR4) interagiam quimicamente com o reagente de WST, nós padronizamos as três concentrações que não interagiram com todos os extratos e mostraram-se adequadas para o teste de viabilidade celular, como: 0,020, 0,039 e 0,078 mg/mL, demonstrado na figura 11. Nas três concentrações dos extratos testadas no ensaio WST-8 a viabilidade das células foi próxima a 100%.

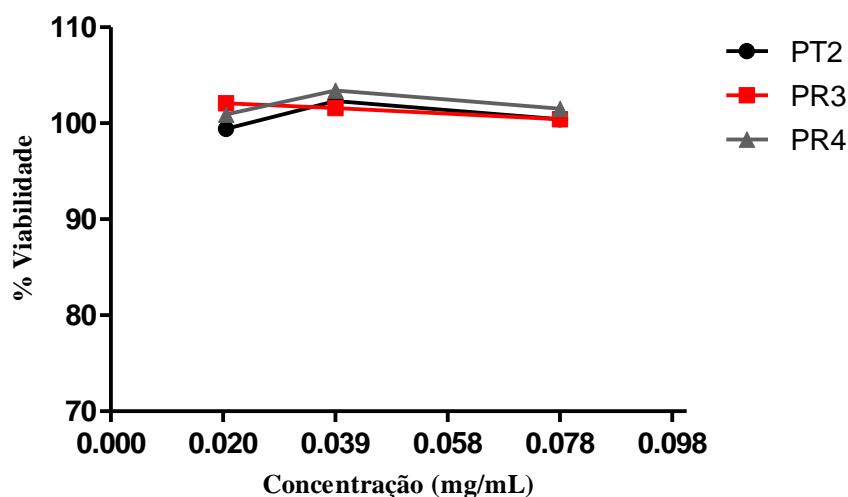


Figura 11 – Efeito dos extratos de *Pouteria torta* (PT2) e *Pouteria ramiflora* (PR3 e PR4) sobre a viabilidade celular de células RAW 264.7, nas concentrações viáveis de serem analisadas pelo método de WST-8. Os resultados foram expressos como a média \pm DP da porcentagem de células viáveis em 3 experimentos independentes. A viabilidade celular foi representada graficamente como uma porcentagem do controle (assumindo os dados obtidos a partir da ausência de extratos como 100% de células viáveis)

4.3.2. Ensaio utilizando como reagente Vermelho Neutro

4.3.2.1. Interação dos extratos das plantas com o reagente Vermelho Neutro

Para avaliar o efeito citotóxico do extrato da planta, também foi realizado o teste de incorporação do vermelho neutro, o qual analisa a viabilidade celular. Da mesma forma, antes da interação dos extratos com as células RAW 264.7, foi realizado um ensaio de interação simples entre os extratos de plantas nas concentrações utilizadas no ensaio WST, mas com o corante vital vermelho neutro para avaliarmos se havia interação química nesta reação. Na análise do ensaio, consideramos que não ocorreu interação quando as concentrações de absorbância (D.O. em 492nm) foram inferiores ao branco do reagente vermelho neutro utilizado. Neste caso, a absorbância do branco foi de 0,5 e nenhuma das concentrações dos extratos apresentaram interferência do reagente para os três extratos de plantas testados (figura 12).

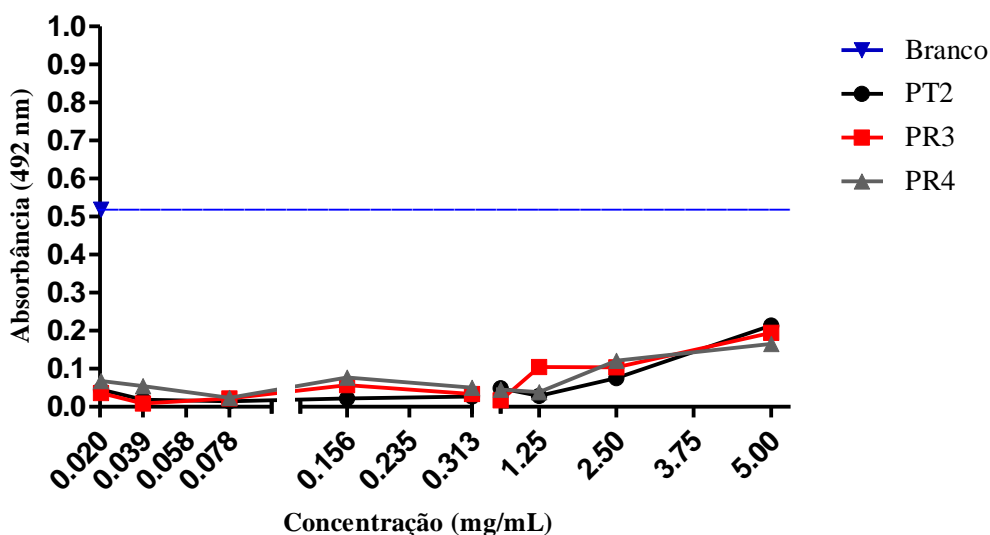


Figura 12 – Análise da interação química entre os extratos de *Pouteria torta* (PT2) e *Pouteria ramiflora* (PR3 e PR4) nas diferentes concentrações utilizadas e o reagente vermelho neutro. Os resultados foram obtidos por meio da média \pm DP das triplicatas de três experimentos independentes.

4.3.2.2. Efeito dos extratos sobre a viabilidade celular de RAW 264.7 pelo método de Vermelho Neutro

Ainda para avaliar se os extratos de *Pouteria* spp. eram tóxicos para as células utilizamos o método de incorporação do vermelho neutro em que foram testadas diluições com várias concentrações diferentes dos extratos os quais não apresentaram interações químicas com o reagente vermelho neutro, conforme o ensaio anterior, e descontado no cálculo da densidade ótica do branco das amostras. Os resultados obtidos demonstraram que nenhuma das concentrações utilizadas interagiam quimicamente como o reagente vermelho neutro, o que viabilizou o emprego deste método para análise da citotoxicidade de diferentes concentrações dos extratos utilizados.

Das nove concentrações utilizadas três apresentaram alguma citotoxicidade para as células: 5, 2,5, 1,25 mg/mL (figura 13), principalmente com o extrato PT2, onde a viabilidade celular diminuiu para 70% a partir da concentração 1,25 mg/mL, e para o extrato PR4 que diminuiu a viabilidade de 90 para 70% a partir de 1,25 mg/mL até a concentração máxima.

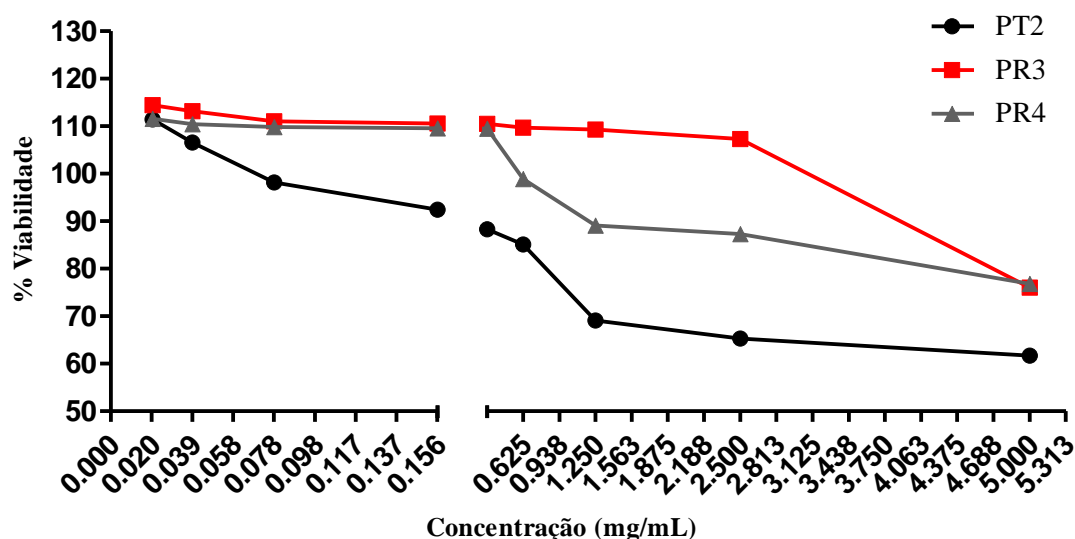


Figura 13 – Efeitos dos extratos de *Pouteria torta* (PT2) e *Pouteria ramiflora* (PR3 e PR4) sobre a viabilidade celular de células RAW 264.7, analisadas conforme o método de incorporação do vermelho neutro. Os resultados foram expressos como a média \pm DP da porcentagem de células viáveis em três experimentos independentes. A viabilidade celular foi representada graficamente como uma porcentagem do controle (assumindo os dados obtidos a partir da ausência de extratos como 100% de células viáveis)

A partir dos resultados de viabilidade celular e citotoxicidade, excluímos as concentrações dos extratos que foram tóxicas para as células e também as que interagiam

quimicamente com o reagente, dessa forma, padronizamos as concentrações 0,078, 0,039, 0,020 mg/mL, dos extratos PT2, PR3 e PR4 no tempo de 48 horas, a serem testadas a partir dos próximos ensaios.

4.4. Expressão gênica

4.4.1. Quantificação relativa dos transcritos dos genes *NFkb*, *Tnfa*, *IL-6*, *iNOS* e *Cox-2* após tratamento com extrato etanólico de *Pouteria torta* (PT2)

A análise da quantificação relativa dos transcritos dos cinco genes apresentados após o tratamento com PT2 nas concentrações 0,078, 0,039, 0,020 mg/mL de maneira geral, apresentaram uma repressão na expressão de todos os genes. Essa repressão foi maior para os grupos G3/G2 quando comparado ao grupo calibrador G2/G1 de cada gene na concentração 0,078 mg/mL de PT2, e foi um pouco menor para a concentração seguinte 0,039 mg/mL de PT2 para os grupos G4/G2 quando comparado ao grupo calibrador G2/G1 de cada gene e aos grupos G3/G2.

Na concentração mais diluída do extrato PT2, que era de 0,020 mg/mL esperávamos que o padrão de repressão diminuísse ainda mais que as observadas nos grupos G4/G5 em todos os genes, entretanto o padrão de repressão de genes observado foi inferior ao do grupo G3/G2, chamando a atenção para um padrão de repressão pouco esperado a medida que a diluição do extrato aumenta. O que pode ser observado quando verificamos as barras sobre os gráficos de comparação em número de vezes que o gene está reprimido em relação ao calibrador G2/G1 estimulado com LPS. Esse evento biológico repete-se em todos os cinco genes inflamatórios analisados e será mais aprofundado na discussão do trabalho.

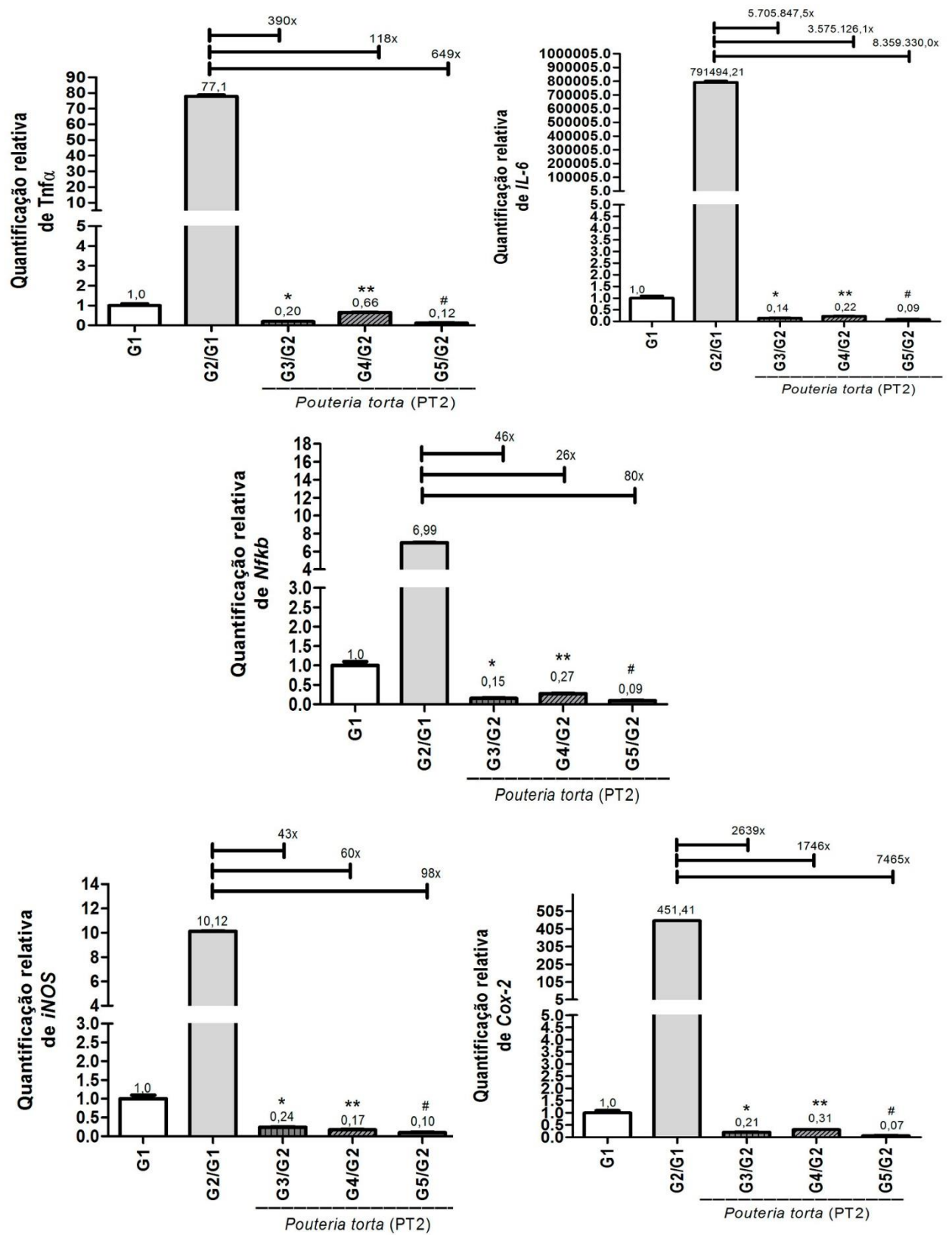


Figura 14 - Modulação da expressão gênica de células RAW 264.7 após tratamento com o extrato etanólico de *P. torta* (PT2)

Quantidade relativa de transcritos de *NFkb*, *Tnfα*, IL-6, *iNOS* e *Cox-2* nos grupos G1 (não tratado), Grupo calibrador 1 - G2/G1 número de vezes que o gene é mais (+) ou menos (-) expresso no Grupo 2 em relação ao Grupo 1, Grupo calibrador 2 - G3/G2 número de vezes que o gene é mais (+) ou menos (-) expresso nos Grupo 3 (PT2 na concentração 0,078 mg/mL) em relação ao Grupo 2, G4/G2 número de vezes que o gene é mais (+) ou menos (-) expresso nos Grupo 3 (PT2 na concentração 0,039 mg/mL) em relação ao Grupo 2 e G5/G2 número de vezes que o gene é mais (+) ou menos (-) expresso nos Grupo 3 (PT2 na concentração 0,020 mg/mL) em relação ao Grupo 2. Análise de Variância (ANOVA) com pós-teste de *Dunnnett* revelaram diferenças estatisticamente significativas * $p < 0,0001$, ** $p < 0,0001$ e # $p < 0,0001$ entre o grupo calibrador 1 (G2/G1) comparado aos grupos assinalados

4.4.2. Quantificação relativa dos transcritos dos genes *NFkb*, *Tnfα*, IL-6, *iNOS* e *Cox-2* após tratamento com extrato aquoso de *Pouteria ramiflora* (PR3)

Analisando a quantificação relativa dos transcritos dos cinco genes apresentados após o tratamento com PR3 nas concentrações 0,078, 0,039, 0,020 mg/mL, observamos que para os cinco genes avaliados aparecem reprimidos, mostrando a atividade anti-inflamatória dos extratos testados.

Os grupos G6/G2 de todos os genes foram os que apresentaram maior repressão na expressão dos genes após o tratamento com a concentração de 0,078 mg/mL de PR3. Na concentração seguinte 0,039 mg/mL essa repressão foi reduzida nos grupos G7/G2 de todos os genes, mas continua extremamente significativa, e quando o tratamento com a concentração mais diluída de PR3 (0,020 mg/mL) é observada verificamos que esse efeito de repressão dos genes nos grupos G8/G2 é maior que o observado para a repressão dos genes com o extrato de PR3 na concentração de 0,039 mg/mL empregada no tratamento anterior, mas inferior a observada na maior concentração do extrato testada, 0,078 mg/mL de PR3.

Os resultados observados reforçam que a maior concentração do extrato de PR3 testada apresentou maior efeito na repressão dos genes, entretanto chama novamente a nossa atenção para a repetição do evento biológico observado com a concentração mais diluída do extrato testada. Embora, observando as barras comparativa do número de vezes que o gene está reprimido em relação ao calibrador G2/G1 estimulado com LPS percebemos que a diferença entre os grupos G7/G2 e G8/G2 é menor que a observada na figura anterior.

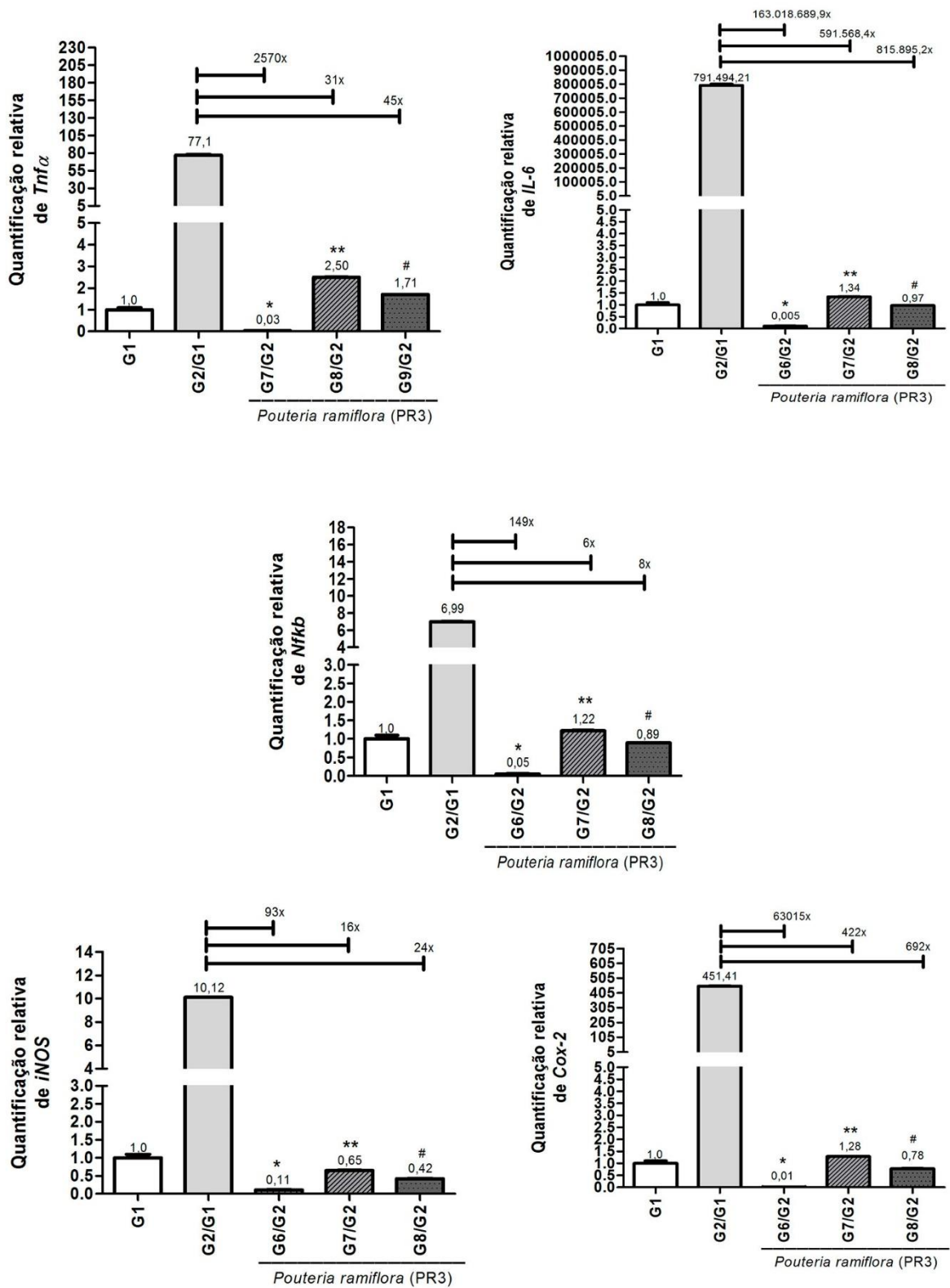


Figura 15 - Modulação da expressão gênica de células RAW 264.7 após tratamento com o extrato aquoso de *Pouteria ramiflora* (PR3)

Quantidade relativa de transcritos de *NFkb*, *Tnfa*, *IL-6*, *iNOS* e *Cox-2* nos grupos G1 (não tratado), Grupo calibrador 1 - G2/G1 número de vezes que o gene é mais (+) ou menos (-) expresso no Grupo 2 em relação ao Grupo 1, Grupo calibrador 2 – G6/G2 número de vezes que o gene é mais (+) ou menos (-) expresso nos Grupo 6 (PR3 na concentração 0,078 mg/mL) em relação ao Grupo 2, G7/G2 número de vezes que o gene é mais (+) ou menos (-) expresso nos Grupo 7 (PR3 na concentração 0,039 mg/mL) em relação ao Grupo 2 e G8/G2 número de vezes que o gene é mais (+) ou menos (-) expresso nos Grupo 8 (PR3 na concentração 0,020 mg/mL) em relação ao Grupo 2. Análise de Variância (ANOVA) com pós-teste de *Dunnett* revelaram diferenças estatisticamente significativas * $p < 0,0001$, ** $p < 0,0001$ e # $p < 0,0001$ entre o grupo calibrador 1 (G2/G1) comparado aos grupos assinalados

4.4.3. Quantificação relativa dos transcritos dos genes *NFkb*, *Tnfa*, *IL-6*, *iNOS* e *Cox-2* após tratamento com extrato etanólico de *Pouteria ramiflora* (PR4)

A quantificação relativa dos transcritos dos cinco genes apresentados após o tratamento com PR4 nas concentrações 0,078, 0,039, 0,020 mg/mL foi a que menos reprimiu a expressão dos genes estudados. A concentração de 0,078 mg/mL para os genes *NFkb* e *iNOS* apresentou um efeito indutor para a expressão do gene, aumentando no grupo G9/G2 sua expressão acima no grupo calibrador G2/G1. Para os demais genes *Tnfa*, *IL-6* e *Cox-2*, cujos grupos calibradores G2/G1 modularam fortemente a expressão do gene, esse efeito não foi observado, mostrando que houve uma repressão sobre estes genes.

Observamos que ocorre um estímulo dose depende para todos os genes, o extrato PR4 parece agir inicialmente como um indutor de todos os genes. Contudo, como há inibição significativa em relação ao calibrador G2/G1, pode haver substâncias atuando como inibidores também. Este fenômeno poderia ser explicado pela atuação de diferentes substâncias presentes em PR4, o qual trata-se de uma mistura de substâncias (fitocomplexo), que atuam em possíveis alvos celulares diferentes e com atividades distintas. Conforme os ativos são diluídos, a atividade das substâncias indutoras da expressão destes genes é diminuída e a atividade de substâncias repressoras passam a ser melhor observadas.

Quando observamos as concentrações do extrato PR4 nas concentrações 0,039 e 0,020 mg/mL para todos os genes, verificamos que nos grupos G10/G2 e G11/G2, os genes são reprimidos a medida em que a diluição aumenta, encontramos o mesmo efeito observado mais discretamente nos gráficos anteriores que avaliam o efeito dos extratos de PT2 e PR3 sobre estes genes, e que aqui sob estímulo do extrato PR4 torna-se mais evidente. Principalmente quando observamos as barras comparativa do número de vezes que o gene está reprimido em relação ao calibrador G2/G1 estimulado com LPS.

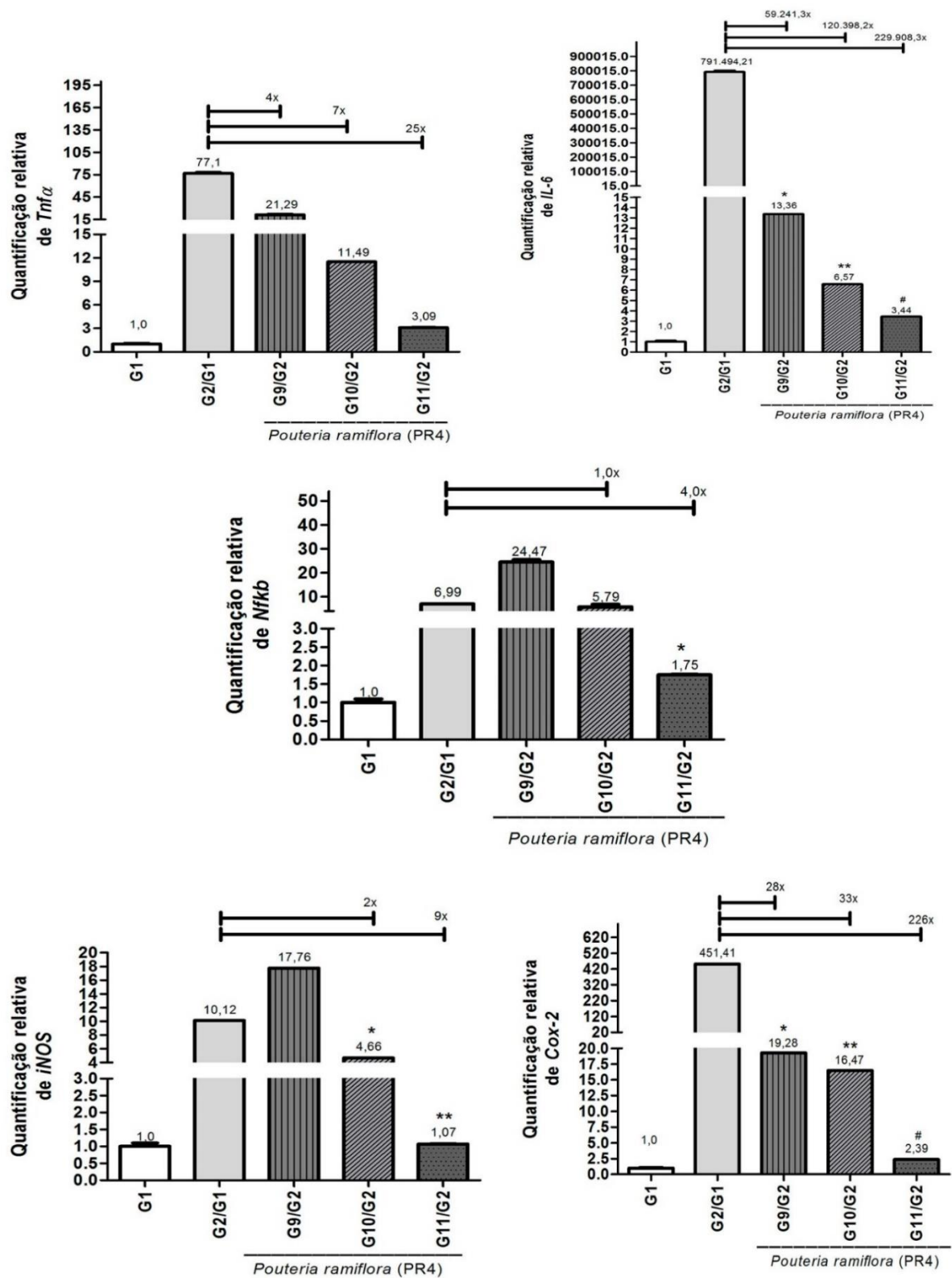


Figura 16 - Modulação da expressão gênica de células RAW 264.7 após tratamento com o extrato etanólico de *Pouteria ramiflora* (PR4)

Quantidade relativa de *Nfkb*, *Tnfα*, *IL-6*, *iNOS* e *Cox-2* nos grupos G1 (não tratado), Grupo calibrador 1 - G2/G1 número de vezes que o gene é mais (+) ou menos (-) expresso no Grupo 2 em relação ao Grupo 1, Grupo calibrador 2 - G9/G2 número de vezes que o gene é mais (+) ou menos (-) expresso nos Grupo 9 (PR4 na concentração 0,078

mg/mL) em relação ao Grupo 2, G10/G2 número de vezes que o gene é mais (+) ou menos (-) expresso nos Grupo 10 (PR4 na concentração 0,039 mg/mL) em relação ao Grupo 2 e G11/G2 número de vezes que o gene é mais (+) ou menos (-) expresso nos Grupo 11 (PR4 na concentração 0,020 mg/mL) em relação ao Grupo 2. Análise de Variância (ANOVA) com pós teste de *Tukey* revelaram diferenças estatisticamente significativas * $p < 0,0001$, ** $p < 0,0001$ e # $p < 0,0001$ entre os grupos assinalados

4.5. Dosagem de Óxido Nítrico

Para avaliar os efeitos dos diferentes extratos na produção de óxido nítrico (NO), a quantidade de nitrito (NO₂⁻) foi mensurada no sobrenadante de cultura, utilizando o reagente de Griess.

Os resultados apresentados na figura 17, evidenciam que o extrato PT2 reduziu significativamente a produção de óxido nítrico em todas as concentrações do extrato analisadas quando comparadas à produção de NO induzida pelo estímulo com LPS. Estes resultados refletem os observados na repressão do gene *iNOS* com o mesmo tratamento, se o gene foi reprimido, esperava-se uma diminuição da produção de óxido nítrico, confirmando os resultados obtidos.

Para o extrato PR3 houve uma grande diminuição na produção de óxido nítrico após o tratamento com o extrato de PR3 na concentração de 0,078 mg/mL, e reduções menores foram observadas nas demais concentrações testadas, também reproduzem os resultados observados para o gene *iNOS* com o mesmo tratamento, mostrando uma menor produção de NO quando houve maior repressão do gene, e uma concentração ajustada na produção desta molécula a medida que o gene foi menos reprimido.

E finalmente, no último extrato testado PR4, confirmamos a nossa hipótese anterior em relação aos genes *NFkb* e *iNOS*, onde inicialmente sugerimos um efeito indutor para a expressão do gene, que estava aumentado no grupo G9/G2, provavelmente devido à baixa expressão do grupo calibrador G2/G1. Após a dosagem de óxido nítrico observamos que a medida que a repressão do gene aumentou a produção de óxido nítrico diminuiu, confirmando estes resultados.

De maneira geral, observamos na figura 17, que os extratos apresentaram atividade anti-inflamatória sobre as células RAW 264.7, reduzindo a produção de NO proporcionalmente quando comparado ao controle estimulado com LPS e em uma análise mais completa quando avaliado conjuntamente com a expressão do gene *iNOS*.

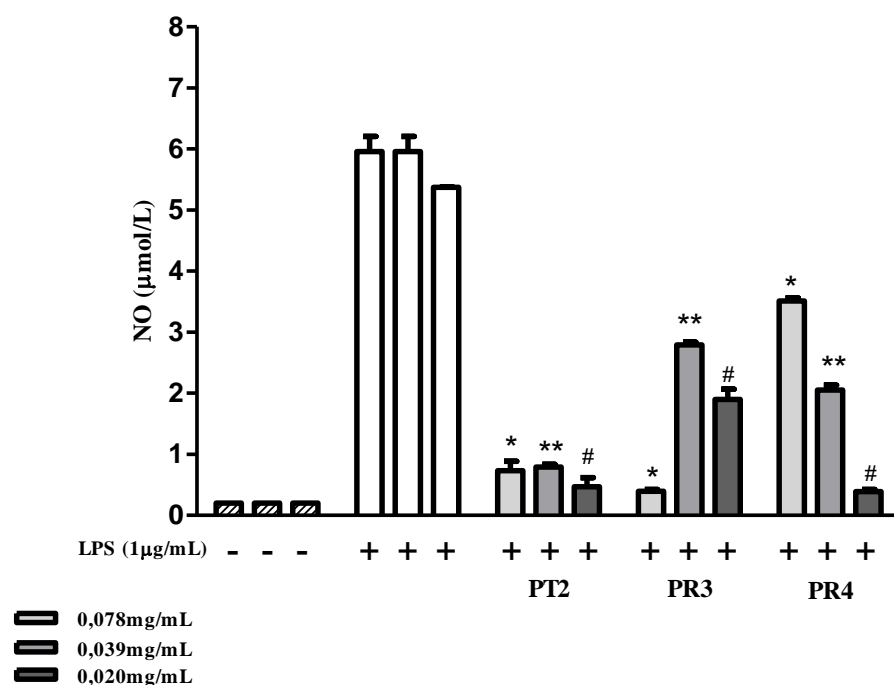


Figura 17 – Níveis de produção de óxido nítrico no sobrenadante de macrófagos RAW 264.7 incubados com os extratos PT2, PR3 e PR4 nas concentrações: (0,078 mg/mL, 0,039 mg/mL e 0,020 mg/mL) e estimulados com 1µg/mL de LPS, durante 48 horas

Análise de Variância (ANOVA) com pós-teste de *Dunnnett* revelaram diferenças estatística significativas de $*p<0,0002$, $**p<0,0002$ e $#p<0,0003$ em relação ao grupo controle positivo macrófagos incubados e estimulados com LPS (positivo). Os resultados de NO foram expressos em µmol/L e representam a média ± DP de três experimentos independentes

4.6. Dosagem de Prostaglandina E₂ (PGE₂)

Os níveis de PGE₂ produzidos durante a inflamação das células com LPS e tratamento com os extratos (PT2, PR3 e PR4) nas concentrações 0,078, 0,039 e 0,020 mg/mL, foram mensurados nos sobrenadantes da cultura das células após 48 horas. Na figura 18, observamos uma redução dos níveis de prostaglandina E₂ por todos extratos e concentrações, comparando aos níveis produzidos pelos grupos controles NT (células incubadas com o meio) e CP (células estimuladas com LPS), demonstrando que os extratos apresentaram atividade anti-inflamatória.

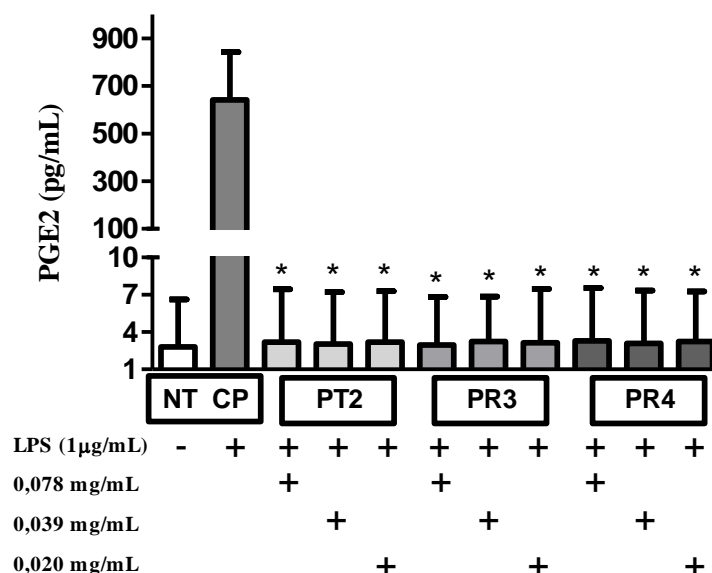


Figura 18- Efeito inibitório da produção de PGE₂ sobre macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS após 48 horas de tratamento com extratos PT2, PR3 e PR4 nas concentrações 0,078, 0,039 e 0,020 mg/mL. NT- células RAW 264.7 não tratadas e CP – controle positivo (células RAW 264.7 tratadas com LPS). Análise de Variância (ANOVA) com pós-teste de *Dunnnett* revelaram diferenças estatística significativas de $*p < 0,0001$ em relação ao grupo controle positivo macrófagos incubados e estimulados com LPS (positivo). Os resultados de PGE₂ foram expressos em pg/mL e representam a média ± DP de três experimentos independentes.

4.7. Dosagem de Glutaciona (GSH)

Para verificar se os extratos utilizados (PT2, PR3 e PR4) apresentavam atividade antioxidante, diminuindo o estresse oxidativo causado pela inflamação com o LPS nas células RAW 264.7, foi realizada a dosagem de glutaciona. Assim, testamos duas concentrações de cada extrato, já empregadas nos outros ensaios 0,039 e 0,020 mg/mL.

Nossos dados revelaram que as células RAW 264.7 não tratadas (NT) apresentaram níveis normais de glutaciona, que diminuiram após estas células receberem tratamento com LPS (CP). O tratamento com os extratos PT2, PR3 e PR4 nas concentrações 0,039 e 0,020 mg/mL restauraram os níveis da glutaciona, conferindo atividade antioxidante quando comparado ao CP tratado com LPS (figura 19). Sobretudo, na concentração de 0,020 mg/mL que para os três extratos vinha apresentando atividade anti-inflamatória potente e também respondeu à produção de glutaciona com atividade antioxidante.

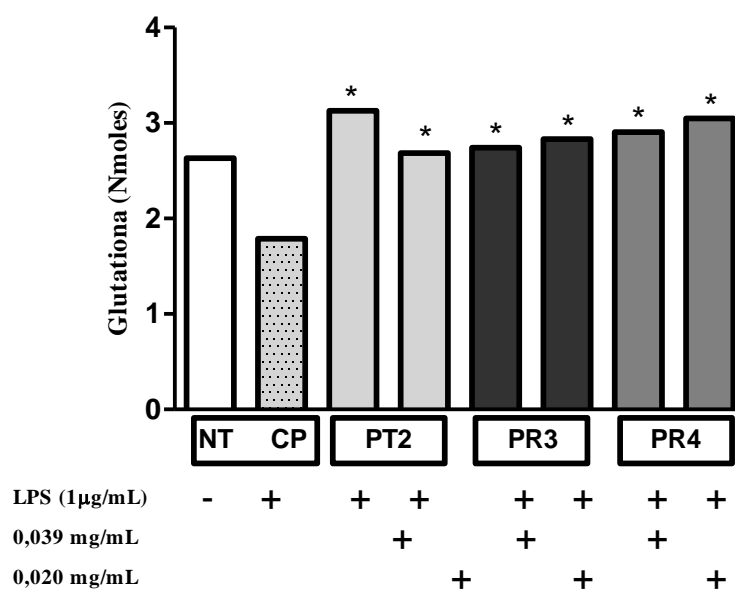


Figura 19 - Produção de Glutathione em macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS após 48h de tratamento com extratos PT2, PR3 e PR4 nas concentrações 0,039 e 0,020 mg/mL

Os resultados dos níveis de glutathione foram realizados em duplicata e expressos em Nmoles. NT- células RAW 264.7 não tratadas, CP – controle positivo (células RAW 264.7 tratadas com LPS) e P – padrão ou substância comercial com um valor conhecido de glutathione. Análise de Variância (ANOVA) com pós-teste de *Dunnett* revelaram diferenças estatística significativas de $*p < 0,0001$ em relação ao grupo controle positivo macrófagos estimulados com LPS (CP). Os resultados de glutathione foram expressos em Nmoles e representam a média \pm DP da duplicata de dois experimentos independentes.

5. DISCUSSÃO

A inflamação é um processo complexo regulado por diversas células imunes e moléculas efetoras como o NO e citocinas pró-inflamatórias (LEE *et al.*, 2011; CLARK *et al.*, 2013; LAVETI *et al.*, 2013), e está presente em uma variedade de doenças agudas e crônicas tais como choque séptico, câncer, diabetes, aterosclerose, artrite reumatoide, asma entre outros (PYEE *et al.*, 2014; DE FELICE *et al.*, 2014; HENEKA *et al.*, 2014; TALL *et al.*, 2015). A inibição de mediadores inflamatórios por meio de moduladores farmacológicos tem sido demonstrada como uma efetiva estratégia terapêutica para reduzir reações inflamatórias e riscos a doenças inflamatórias (LEE *et al.*, 2011; CLARK *et al.*, 2013; LAVETI *et al.*, 2013).

As doenças inflamatórias crônicas são a principal causa de morbidade e de impacto no ambiente de trabalho e funcionamento social e são responsáveis por cerca de 35 a 52 milhões de mortes anuais em todo o mundo (MATHESON *et al.*, 2013; PRUIMBOOM *et al.*, 2015).

Dessa forma, vários pesquisadores têm se esforçado com o intuito de desenvolver agentes anti-inflamatórios com mínimos efeitos adversos para a prevenção de várias doenças inflamatórias ao passo que informações etnofarmacológicas poderiam auxiliar na identificação de vários produtos naturais valiosos tornando-os candidatos atraentes e com menos efeitos adversos, porém com a mesma eficácia elevada encontrada em medicamentos sintéticos. Muitos estudos têm relatado vários compostos isolados de plantas como forte potencial a agentes anti-inflamatórios para o tratamento de várias patologias (SUHR *et al.*, 2001; LI E VERMA, 2002; NAM, 2006; KIM *et al.*, 2013).

O gênero *Pouteria* é um grupo tropical de plantas que pertencem a família *Sapotaceae* consistindo de 325 espécies (TRIONO *et al.*, 2007) em que apresenta grande significância comercial pela alta qualidade da madeira e de seus frutos. Além de ser utilizada na construção civil e alimentação, várias espécies têm sido utilizadas na medicina popular, apresentando vários compostos químicos e propriedades biológicas tais como anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana e antidisentérica. Apesar disso, o seu verdadeiro potencial como fonte para produção de fármacos é pouco conhecido (SILVA *et al.*, 2009).

No presente estudo, investigamos os efeitos anti-inflamatórios e antioxidante de extratos brutos de duas espécies do gênero *Pouteria*, *Pouteria torta* e *Pouteria ramiflora*. Na primeira espécie utilizando o extrato etanólico e na segunda os extratos aquoso e etanólico, frente a células RAW 264.7, um modelo de macrófagos murinos altamente responsivos a estímulos inflamatórios, excelente para investigar drogas anti-inflamatórias e avaliar inibidores de vias de

sinalização levando a indução de citocinas pró-inflamatórias (ROSSOL *et al.*, 2011; FAN *et al.*, 2013). Estas células foram estimuladas com lipopolissacarídeo de bactérias gram-negativas (LPS) com o objetivo de simular uma resposta inflamatória. A estimulação de macrófagos com LPS induz a alta produção de NO pela iNOS e PGE₂, e pela ciclooxigenase (COX-2), portanto, um reagente que previna a liberação desses mediadores ou regule a expressão de iNOS e COX-2 pode possuir atividade anti-inflamatória (JUNG *et al.*, 2009; HONG *et al.*, 2014).

O ponto de partida do nosso estudo foi a definição de uma cinética de concentração de LPS em diferentes concentrações e tempos de cultivo, para avaliar qual melhor estimulava as células RAW 264.7. A análise do estímulo foi realizada por meio da produção de óxido nítrico. O NO é reconhecido como um mediador das respostas inflamatórias. Estímulos de macrófagos com LPS desencadeia alta produção de NO pela indução da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (TONG *et al.*, 2014). Nossos resultados demonstraram que a melhor concentração de LPS bem como o melhor tempo de indução do mediador inflamatório foi 1 µg/mL, no tempo de 48 horas. Esses resultados da concentração utilizada assemelham-se a alguns trabalhos com macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS (MUELLER *et al.*, 2010; HONG *et al.*, 2014).

Na sequência, nossos resultados demonstraram que o estímulo das células com 1 µg/mL de LPS, para avaliação da produção de NO, foi dependente da quantidade de células utilizadas nos experimentos, e que um ajuste na concentração de células aumentou a produção do mediador inflamatório. Entretanto, em relação ao tempo como não houve diferença significativa na produção de NO comparando-se 48 horas com o ensaio no tempo de 72 horas, e preservando a viabilidade celular para a recepção do tratamento, optamos por trabalhar com o tempo de 48 horas. Além disso, sabe-se que, em níveis elevados por tempo prolongado, o NO pode inibir a expressão de iNOS em macrófagos e terminar o processo inflamatório (PENG *et al.*, 1998) razão pela qual mantivemos o tempo de 48 horas.

Para eliminarmos compostos inadequados para pesquisas clínicas, é necessário primeiramente realizarmos testes pré-clínicos, evitando despesas desnecessárias. Assim, a utilização de cultura de células no ensaio pré-clínico inicial de compostos terapêuticos tornou-se prática comum, podendo ser selecionados para a simulação de uma doença de interesse ou de anormalidades bioquímicas associadas. Neste sentido, para se obter resultados confiáveis e precisos, é necessário a realização de testes e ensaios *in vitro* de citotoxicidade, pois estes dados podem influenciar no sucesso do candidato a fármaco em desenvolvimento (TONDER *et al.*, 2015).

O ensaio de viabilidade celular tem se destacado como uma alternativa ao uso de animais, sendo útil por exemplo, no rastreio de um grande número de químicos para a citotoxicidade de diversas células. É utilizada também no tratamento do câncer, em quimioterapias, para selecionar uma droga anticancerígena bem como sua melhor dose. Assim, corantes têm sido aplicados em ensaios colorimétricos de viabilidade celular, onde marcam as células em vários locais, para distinguir entre células vivas e células mortas pela detecção de membranas plasmáticas comprometidas. Além disso, outros ensaios de citotoxicidade colorimétricos tentam determinar o mecanismo da morte celular induzida (MOSSMAN *et al.*, 1983).

Considerando a necessidade de avaliar se os extratos utilizados nos experimentos apresentam citotoxicidade, foram utilizados dois métodos colorimétricos diferentes de citotoxicidade *in vitro* para determinar a melhor concentração capaz de desempenhar atividade biológica sem ser tóxica para célula.

O primeiro teste utilizado foi o WST-8, baseado no MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide), ensaio que tem sido considerado padrão-ouro para a determinação da viabilidade e proliferação celular desde seu desenvolvimento por Mosmann, na década de 1980, que mede a viabilidade das células em termos de atividade redutora com a conversão enzimática por desidrogenases do composto tetrazólio a cristais insolúveis de formazan em água ocorrendo na mitocôndria de células vivas, embora a redução por agentes e enzimas localizadas em outras organelas tais como o retículo endoplasmático também estejam envolvidas.

Várias modificações têm sido aplicadas para aperfeiçoar a simplicidade e sensibilidade desse ensaio. Deste modo, ensaios baseados em tetrazólio foram desenvolvidos tais como XTT, MTS e WST, em que os produtos de formazan são solúveis em água, eliminando-se assim a necessidade de processos de lavagem e solubilização dos cristais formados com solvente.

O segundo teste colorimétrico foi o ensaio de incorporação do vermelho neutro em que se baseia na capacidade de células viáveis de incorporar e ligar ao corante vermelho neutro. A integridade lisossomal, com a concomitante ligação do corante vermelho neutro, é um indicador muito sensível da viabilidade celular (REPETTO *et al.*, 2008).

Entre os dois testes de viabilidade celular realizados, o que menos apresentou interação química com os extratos, além de ter sido mais sensível, foi o vermelho neutro. Esse ensaio apresenta baixa interferência, e não usa reagente instável, como requeridos em testes de

viabilidade celular usando sais de tetrazólio (MTT, MTS, XTS etc.), é mais sensível e requer menos equipamentos (BOREFREUND *et al.*, 1988).

Apesar de serem encontrados na literatura dados que reportam atividades biológicas das espécies *Pouteria torta* e *Pouteria ramiflora*, poucos são os estudos que demonstram essas atividades em modelos pré-clínicos. Dentre os estudos que apresentam atividades imunomoduladoras e de citotoxicidade podemos citar o de Napolitano *et al.* (2005), que testou os extratos hexânicos e etanólicos de *Pouteria ramiflora* em macrófagos J774 estimulados com LPS e IFN- γ e concluíram que esses extratos não foram capazes de inibir a produção de óxido nítrico, além de não apresentarem citotoxicidade no teste de avaliação de viabilidade celular, MTT.

Fontes-Junior (2009) investigou em seu estudo as atividades antinociceptivas e anti-inflamatórias do extrato etanólico da raiz de *Pouteria ramiflora* em camundongos e ratos pelos métodos da placa quente e da bolsa de ar, concluindo que a concentração do extrato utilizada não apresentou toxicidade e demonstrou atividade antinociceptiva e anti-inflamatória satisfatória diminuindo de forma significativa as contorções abdominais e a produção de óxido nítrico.

O extrato hexânico, etanólico e aquoso de folhas de *Pouteria ramiflora* e *Pouteria torta* e de frações desses extratos, além do extrato metanólico de folhas de *Pouteria torta*, ao serem avaliados quanto ao perfil de citotoxicidade em larvas de *Artemia Salina* concluíram que a fração aquosa do extrato etanólico de *P. ramiflora* e o extrato aquoso de *P. torta* na concentração 0,28 mg/mL foram tóxicas para a larva (PERFEITO *et al.*, 2005).

Além disso, no estudo de Elias *et al.* (2013) a avaliação da atividade citotóxica foi realizada em células tumorais com o corante cristal violeta, com o objetivo de tratar as células com os extratos etanólico, aquoso e hexânico de folhas de *Pouteria torta* em variadas concentrações (1000, 750, 500, 250 e 125 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) que induzissem a morte celular em carcinoma de células escamosas humanas oral e linhagens de células de carcinoma de mama e assim apresentassem potencial atividade anticancerígena. Os resultados demonstraram que todos os extratos foram citotóxicos para ambas as células, e também que os extratos de *P. torta* podem conter compostos úteis para combater o câncer oral e de mama, e este estudo destacou a relevância biológica do bioma cerrado brasileiro na terapia contra o câncer.

Em nosso estudo mostramos que a produção de óxido nítrico aumentou consideravelmente em células tratadas com LPS (controle positivo) quando comparado com as células não estimuladas (controle negativo), esse resultado corrobora com os dados de outros

estudos (KACEM *et al.*, 2015; ZHOU R. *et al.*, 2015; SONG *et al.*, 2014; KIM *et al.*, 2013), além disso, os extratos foram capazes de reduzir a produção de óxido nítrico.

Na análise da expressão gênica, o controle positivo também exibiu um aumento nos níveis de expressão de mRNA de *iNOS*, *COX-2*, *NFkB*, *IL-6* e *TNF- α* comparados com as células não tratadas.

Demonstramos também que para os extratos PT2 e PR3 todas as concentrações de extratos utilizadas (0,078, 0,039 e 0,020 mg/mL) foram capazes de reduzir a expressão dos genes analisados em comparação com o controle positivo, já para o extrato PR4 a repressão dos genes foi dose dependente, a medida em que a diluição do extrato aumentou o efeito repressor foi melhor visualizado, provavelmente em decorrência de dois fatos: o extrato PR4 é um fitocomplexo e pode está induzindo um efeito prozona.

Os fitocomplexos são substâncias originadas no metabolismo primário e/ou secundário dos extratos das plantas, responsáveis em conjunto, pelos efeitos biológicos de uma planta medicinal ou de seus derivados (BRASIL, 2010). A medida em que diluímos estes extratos, observamos que modulamos os genes estudados e aumentamos a atividade repressora sobre estes, o que sugere que substâncias presentes neste fitocomplexos predominem sobre os efeitos biológicos de repressão de genes observados.

O segundo fato que corrobora com nossos resultados e é pouco associado a concentração de fitocomplexos, é o conceito de efeito prozona. Esse fenômeno em imunologia é descrito como um desequilíbrio entre a quantidade de anticorpo e antígeno presente em uma reação de aglutinação por exemplo, esse excesso que causa desequilíbrio, necessita então de uma concentração equilibrada entre antígeno e anticorpo, que é obtida por diluições sucessiva de tal forma que a concentração de anticorpo caia dentro da zona de equivalência da curva Heidelberger-Kendall e encontre uma quantidade adequada de antígeno que gere resultados corretos, sem riscos de serem reações fracas ou falso negativas (JACOBS *et al.*, 2015).

Embora sejam escassos os relatos desta possível associação, na literatura encontramos um artigo que compara a eficácia citotóxica de anticorpos biespecíficos anti-CD7 e anti-CD38 conjugados com Proteínas Ribossomais Inativadas derivadas de plantas (RIP) ligadas a saponinas, formando as imunotoxinas RIP-saporina que atuam sobre a linhagem celular humana HSB-2 (leucemia linfóide aguda) com atividade anticancerígena. Nestes experimentos, o efeito prozona foi observado em concentrações acima de 0,1nM da imunotoxina, e foi invertido pelo aumento da concentração de saporina no sistema, a fim de conseguir a entrega

eficaz de saporina para o interior da célula (FLAVELL *et al.*, 1995). Extrapolando o raciocínio para nossa hipótese, a medida em que os extratos foram diluídos, principalmente o PR4, observamos que substâncias presentes nestes fitocomplexos podem ter encontrado seu equilíbrio na “zona de equivalência de Heidelberger-Kendall”, e apresentado um efeito repressor ainda mais evidente sobre os genes estudados.

Além dessas hipóteses, sabemos que os fitocomplexos possuem uma grande quantidade de substâncias ativas, e compostos presentes em menor quantidade na planta podem ser responsáveis por apresentar melhores efeitos biológicos. Dessa forma, estudos posteriores devem ser realizados a fim de analisar a potência de frações e de substâncias puras quanto a sua concentração, para assim, definir o principal componente químico responsável pela atividade biológica (FILHO E YUNES, 1998).

Dentre os três extratos estudados ao compararmos os resultados obtidos na expressão gênica e na avaliação do mediador produzido como NO, podemos inferir que o extrato que conferiu maior atividade anti-inflamatória foi o PT2 e ao contrário, o que demonstrou menor atividade anti-inflamatória foi o PR4.

Ainda apontamos também que o melhor mediador inflamatório expresso e modulado após tratamento com extratos foi a IL-6. A IL-6 é considerada uma citocina de grande atividade biológica, a qual auxilia no controle da resposta aguda (LEON *et al.*, 1998) e é conhecida como importante e sensível indicador de respostas inflamatórias (MARTIN *et al.*, 2001).

A expressão de citocinas como *TNF- α* , *IL-6* e outros mediadores inflamatórios como o óxido nítrico e a prostaglandina, liberadas de forma excessiva por macrófagos ativadas em doenças inflamatórias, é regulada pelo *NF κ B*, o qual está envolvido na patogênese de várias doenças crônicas (MARKS-KONCZALIK *et al.*, 1998). Quando esse fator de transcrição de genes inflamatórios não está ativado, este se encontra localizado no citoplasma como um complexo de ligação inativo ao inibidor de *KappaB* e *I κ B- α* . O tratamento com LPS ativa o complexo *I κ B- α* kinase (IKK), resultando na fosforilação, ubiquitinação e degradação de *I κ B- α* , induzindo a translocação do *NF κ B* para o núcleo e assim, causando a transcrição de uma variedade de genes inflamatórios (MAKAROV *et al.*, 2001). Conseqüentemente, substâncias que inibam a ativação de *NF κ B*, são consideradas como potenciais agentes anti-inflamatórios (JOUNG *et al.*, 2012).

Entre nossos resultados, demonstramos a redução da expressão do transcrito *NF κ B*, em relação ao controle positivo, o qual foi responsável por ativar este gene. Assim, nós podemos inferir que os extratos testados apresentam mecanismos de ação anti-inflamatória, o que nos

permitiria sua utilização como agente terapêutico para o tratamento de doenças inflamatórias. A inibição da expressão dos genes utilizados nesse estudo (*COX-2*, *IL-6*, *iNOS* e *TNF- α*) pelos extratos pode possivelmente estar associado a redução da transcrição do NF- κ B, ativador da produção desses genes.

Os compostos capazes de diminuir a produção de NO ou de PGE2 podem ser candidatos atraentes como agentes anti-inflamatórios e, por esta razão, os efeitos inibitórios de compostos naturais nas produções de NO ou de PGE2 têm sido rigorosamente estudados para o desenvolvimento de agentes terapêuticos contra doenças inflamatórias (KIM *et al.*, 2009; ELMANN *et al.*, 2011).

A produção de prostaglandinas em macrófagos tratados com LPS é catalisada principalmente pela ativação transcricional do gene *COX-2*, isso representa um fato crucial no processo inflamatório (LEE *et al.*, 1992; REDDY E HERSCHMAN, 1994). Através de nossos dados podemos concluir que os níveis de prostaglandina diminuíram nas células tratadas com os extratos nas concentrações 0,078, 0,039 e 0,020 mg/mL, além de indicarmos e associarmos também essa regulação com a redução da expressão gênica de transcritos da enzima *COX-2*, tomando como parâmetro o controle positivo.

A defesa contra o efeito negativo de LPS consiste da síntese de antioxidantes nos tecidos e de antioxidantes exógenos fornecido por plantas medicinais (KACEN *et al.*, 2015). A glutatona reduzida (GSH), um tripeptídeo (*γ -glutamylcysteinylglycine*), é o principal tiol livre na maioria das células vivas e está envolvida em muitos processos biológicos, tais como a desintoxicação de xenobióticos, a remoção de hidroperóxidos, e manutenção do estado de oxidação dos grupos sulfidril na proteínas. É considerada um dos principais antioxidante presentes nos tecidos. A glutatona está presente no interior das células, principalmente na forma reduzida (90-95% do total de glutatona) (NAIR *et al.*, 1991).

A oxidação da glutatona conduz à formação de dissulfeto de glutatona (GSSG), o nível de GSH intracelular parece ser um indicador sensível da saúde geral de uma célula, e de a sua capacidade de resistir a toxicidade (NAIR *et al.*, 1991; KALININA *et al.*, 2014). Nosso estudo mostrou que ao estimularmos as células com LPS, houve uma redução da concentração de glutatona, que está aumentada em condições normais como a observada em nosso controle negativo (células sem estímulo). Essa redução pode ser em virtude do acúmulo de espécies reativas de oxigênio como NO, ânion superóxido e peroxinitrito tóxico, produzido por células RAW 264.7 estimuladas com LPS, resultando em um estresse oxidativo que é prejudicial, com um papel na etiologia da inflamação (SEKHAR *et al.*, 2015).

Ao tratarmos com os extratos PT2, PR3 e PR4 nós verificamos que ocorreu um aumento nos níveis de glutathione. Esse aumento indica que essas espécies possuem a função de aumentar a biossíntese da glutathione, ou também em reduzir o estresse oxidativo, conduzindo a uma menor degradação da glutathione, apresentando assim, atividade antioxidante.

Em um estudo com outra espécie de *Pouteria*, a *P. campechiana* foi reportado que o extrato clorofórmico de suas frutas apresentou atividade antioxidante e antinitrosativa em células RAW 264.7 estimuladas com LPS produtoras de NO (MURAKAMI *et al.*, 2005).

Outra espécie do mesmo gênero estudada que demonstrou atividade anti-inflamatória além de cicatrizante foi a *Pouteria lucuma*. Neste estudo foi reportado que o óleo da castanha da “lucuma” como conhecida, foi testada em cultura de macrófagos RAW 264.7 estimuladas com LPS (1 µg/mL) nas concentrações 10 µg/mL, 20 µg/mL, 40 µg/mL e 60 µg/mL, promovendo significativo decréscimo na produção de óxido nítrico em relação aos controles e não apresentando citotoxicidade para as células, assim sendo capaz de modular o processo inflamatório e acelerar a cicatrização dos tecidos (ROJO *et al.*, 2010).

Nossos resultados podem ser explicados pelo fato dos extratos de *Pouteria* serem ricos em compostos fenólicos, os quais exercem atividades anti-inflamatórias de várias formas, entre elas, modulação da via de sinalização MAPK, bloqueio do fator de transcrição NF-κB e da proteína ativadora (AP-1), inibição de citocinas e supressão da atividade das enzimas inflamatórias iNOS e COX-2 (VERES *et al.*, 2012). O principal composto fenólico presente nos extratos de *Pouteria* são os flavonoides (SILVA *et al.*, 2009).

Flavonoides apresentaram efeitos inibitórios consideráveis na expressão de COX-2 (TAKANO-ISHIKAWA *et al.*, 2006) e iNOS (KIM *et al.*, 1999) em macrófagos. Su *et al.* (2014) utilizaram o modelo de inflamação com RAW 264.7 estimuladas com LPS para testar os efeitos de derivados de rutina, um flavonoide abundante presente em uma planta medicinal (*Saussurea involucrata*), e verificaram que o metabólito de rutina, 3,4-dihydroxytoluene (DHT), suprimiu significativamente a produção de óxido nítrico, iNOS e COX-2 além de citocinas pró-inflamatórias como TNF-α, IL-1b e IL-6. Sugerindo que o flavonoide pode ter efeitos anti-inflamatórios *in vitro* (macrófagos RAW 264.7) e potencial adjuvante no tratamento de doenças inflamatórias.

Nossos dados suportam a atividade anti-inflamatória e antioxidantes dos extratos testados, entretanto estudos complementares com substâncias isoladas destes extratos precisam ser realizados para corroborar com nossos resultados.

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho confirmamos que os extratos de *Pouteria torta* e *Pouteria ramiflora* nas concentrações 0,078, 0,039 e 0,020 mg/mL não apresentam toxicidade e possuem atividade anti-inflamatória em células RAW 264.7, o que foi ratificado através das dosagens de óxido nítrico (NO) e prostaglandina E₂. Além disso, avaliamos a atividade antioxidante dos extratos através da dosagem de GSH, que demonstrou que estas concentrações dos extratos diminuíram o estresse oxidativo intracelular.

Para complementar a avaliação anti-inflamatória, verificamos neste modelo celular, a capacidade que estes extratos nas mesmas concentrações testadas apresentaram em modular negativamente a expressão de genes marcadores de inflamação. Os extratos destas plantas, inibiram a expressão de transcritos dos genes inflamatórios *COX-2*, *IL-6*, *iNOS*, *TNF- α* , além do fator de transcrição de genes inflamatórios *NF- κ B* em modelo celular com macrófagos RAW 264.7 ativados com LPS, apontando uma possível atividade anti-inflamatória, que pode ser regulada via *NF- κ B*, o que transformam estes extratos ou fitocomplexos em excelentes alvos terapêuticos.

Sabemos que estes dados preliminares necessitam de estudos complementares, mas acreditamos que estes extratos de plantas pertencentes ao Cerrado brasileiro do entorno de Brasília, apresentam grande potencial terapêutico, e que o estudo contribui para estimular novas investigações e futuras descobertas.

REFERÊNCIAS

ADEFUYE, A.; SALES, K. Regulation of Inflammatory Pathways in Cancer and Infectious Disease of the Cervix. **Rev. Scientifica (Cairo)**, v. 2012, 548150, 2012.

AGARWAL, R. B.; RANGARI, V. D. Antiinflammatory and Antiarthritic Activities of Lupeol and 19A -H Lupeol Isolated From *Strobilanthes Callosus* and *Strobilanthes Ixiocephala* Roots. **Drugs**, v.35, n. 165206, p. 384–387, 2003.

AKTAN, F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. **Rev. Life Sciences**, v.75, n.6, p.639-53, 2004.

ALDERTON, W.K., COOPER, C.E., KNOWLES, R.G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochemical Journal**, v. 357, pt.3, p.593 – 615, 2001.

ALMEIDA SP, PROENÇA CEB, SANO SM, RIBEIRO JF. Cerrado: espécies vegetais úteis. Planaltina: Embrapa-CPAC; 1998.

ALVES-ARAUJO, A. *Pouteria* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB14492>>. Acesso em: 14 Jun. 2015.

ARA T, DECLERCK YA. Interleukin-6 in bone metastasis and cancer progression. **Eur J Cancer**, v. 46, p.1223–31, 2010.

ASEERVATHAM, G. S. B. et al. Antioxidant and hepatoprotective potential of *Pouteria campechiana* on acetaminophen-induced hepatic toxicity in rats. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 70, n. 1, p. 1–14, 2014.

ASTRY, B.; HABERTS E.; MOUDGIL, K.D. A Cytokine-Centric View of the Pathogenesis and Treatment of Autoimmune Arthritis. **Rev. Journal of interferon & cytokine research**, v.31, n.12, 2011.

BASSO, L. A.; SILVA, L. H. P.; FETT-NETO, A.G.; JUNIOR, W.F.A.; MOREIRA, I. S.; PALMA, M.S.; CALIXTO, J. B.; FILHO, S. A.; SANTOS, R.R. SOARES, M. B.P.; SANTOS, D. S. The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined molecular targets for treatment of malaria, tuberculosis and T-cell mediated diseases- A Review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, vol. 100, n. 6 p. 475-506, 2005.

BOLETI, A. P. A.; VENTURA, C.A.; JUSTO G.Z. SILVA R. A.; DE SOUZA A. C. T, FERREIRA C.V.; YANO T.; MACEDO M. L. R. Pouterin, a novel potential cytotoxic lectin-like protein with apoptosis-inducing activity in tumorigenic mammalian cells. **Toxicon**, v. 51. P. 1321-1330, 2008.

BOLETI, A. P. D. A et al. Insecticidal and antifungal activity of a protein from *Pouteria torta* seeds with lectin-like properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 2653–2658, 2007.

BORENFREUND, E.; BABICH, H.; MARTIN-ALGUACIL, N. Comparisons of two in vitro cytotoxicity assays-The neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests. **Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA**, v. 2, n. 1, p. 1–6, 1988.

BUCKLEY, C.D; BARONE; NAYAR, S.; C; CAAMAÑO J. Stromal cells in chronic inflammation and tertiary lymphoid organ formation. **Rev. Annu Immunol.**, v.22, p.715-45, 2015.

BRASIL. RDC 14, de dezembro de 2010. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos.

CALABRESE, L.H.; ROSE-JOHN, S.IL-6 biology: implications for clinical targeting in rheumatic disease. **Rev. Rheumatol.**,v. 10, p. 720–727, 2014.

CAMARA-LEMARROY C. R.; GONZALEZ-MORENO E. I.; GARZA F. J. G; FERNANDEZ-GARZA, N. E. Arachidonic Acid Derivatives and Their Role in Peripheral Nerve Degeneration and Regeneration. **Rev.The ScientificWorld Journal**, v. 2012, 168953, 2012.

CARAMORI, S. S.; LIMA, C. S.; FERNANDES, K. F. Biochemical characterization of selected plant species from Brazilian Savannas. **Brazilian Archives of Biology**, v. 47, n. June, p. 253–259, 2004.

CARNEIRO, C.E.; ALVES-ARAÚJO, A.; ALMEIDA JR., E.B.; TERRA-ARAÚJO, M.H. *Sapotaceae* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB217>>. Acesso em: 14 jun. 2015.

CARSWELL EA, OLD LJ, KASSEL RL, GREEN S, FIORE N, WILLIAMSON B. An endotoxininduced serum factor that causes necrosis of tumors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.72, n.9, p. 3666–70, 1975.

CAYMAN, Technical bulletin. p. 5–8, [s.d.]. PROSTAGLANDIN, E. Prostaglandin E 2 ELISA. v. 49, n. 0, p. 40–53, [s.d.], USA. Disponível em: <https://www.caymanchem.com/pdfs/514010.pdf> acesso em 14 nov. 2015.

CHE, C.; KOIKE K., CORDELL G.A.; FONG H. H. S; DOBBEHSTETN R. H. Triterpenes of *Pouteria torta* (Sapotaceae). **J. Nat Prod. (Lloydia)**, v. 43, p. 420-421, 1980.

CHOI, Y.Y.; KIM, M. H.; HAN, J. M.; HONG, J.; LEE, TH.; KIM, S. H.; YANG, W. M. The Anti-inflammatory potential of Cortex Phellodendron in vivo and in vitro: Down-regulation of NO and iNOS through suppression of NF-κB and MAPK activation. **Rev. International Immunopharmacology**, v.19, n.2 p. 214-20, 2014.

CLAVEL, G.; THIOLAT, A.; BOISSIER, M.-C. Interleukin newcomers creating new numbers in rheumatology: IL-34 to IL-38. **Joint Bone Spine**, v. 80, n. 5, p. 449–453, 2013.

CLARK A. K., OLD E. A., AND MALCANGIO M. “Neuropathic pain and cytokines: current perspectives,” **Journal of Pain Research**, vol. 6, pp. 803–814, 2013.

COLEMAN, J. W.; Nitric oxide in immunity and inflammation. **Rev. International Immunopharmacology**, vol.1 p.1397- 1406, 2001.

CORREIA, A.F. ; SEGOVIA, J.F.O ; GONCALVES, M.C.A ; OLIVEIRA, V.L. ; SILVEIRA, D. ; CARVALHO, J.C.T.; KANZAKI, L.I.B. Amazonian plant crude extract screening for activity against multidrug-resistant bacteria. **European Review for Medical and Pharmacological Science**, v. 12, n. 6, p. 369-380, Nov-Dec. 2008.

COSTA, D. L. M. G. et al. Flavonoid Detection in Hydroethanolic Extract of *Pouteria torta* (Sapotaceae) Leaves by HPLC-DAD and the Determination of Its Mutagenic Activity. **Journal of Medicinal Food**, v. 17, n. 10, p. 1103–1112, 2014.

COSTA, A. V. DA et al. Neuroprotective effects of *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk (Sapotaceae) extract on the brains of rats with streptozotocin-induced diabetes. **Metabolic Brain Disease**, v. 28, n. 3, p. 411–419, 2013.

CRAGG, G.M.; BOYD, M.R.; GREVER, M.R.; SCHEPARTZ, S.A. Pharmaceutical prospecting and the potential for pharmaceutical crops – Natural product drug discovery at the United States National Cancer Institute. **Ann Missouri Bot Gard**, vol.82, p.47-53, 1995.

DARSHAN, S.; DORESWAMY, R. Patented antiinflammatory plant drug development from traditional medicine. **Phytotherapy Research**, v. 18, n. September 2003, p. 343–357, 2004.

DAVID V. Aplicação de técnicas cromatográficas na separação e determinação de triterpenos e hidrocarbonetos presentes nas flores, frutos e xilopódio de *Pouteria torta*. São Carlos, 97 p. Dissertação de Mestrado, Química, Universidade Federal de São Carlos. 1993.

DE FELICE, F. G.; FERREIRA, S. T. Inflammation, Defective Insulin Signaling, and Mitochondrial Dysfunction as Common Molecular Denominators Connecting Type 2 Diabetes to Alzheimer Disease. **Diabetes**, v. 63, n. 7, p. 2262–2272, 2014.

DINARELLO CA. Historical insights into cytokines. *Eur J Immunol*, v.37(Suppl 1) p.S34–45, 2007.

DUBOIS, R. N.; ABRAMSON S. B.; CROFFORD, L.; GUPTA, R.A.; SIMON, L. S.; PUTTE, L. B. A. V.; LIPSKY P. E. Cyclooxygenase in biology and disease. **The FASEB journal**, vol. 12, 1998.

DUQUE, G.A.; DESCOTEAUX, A. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infection diseases. **Rev. Frontiers in immunology**, v. 5, n. 491, 2014.

ELIAS, S. T. et al. Cytotoxic effect of *Pouteria torta* leaf extracts on human oral and breast carcinomas cell lines. **Journal of cancer research and therapeutics**, v. 9, n. 4, p. 601–6, 2013.

ELMANN, A. et al. Anti-Neuroinflammatory effects of the extract of *Achillea fragrantissima*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 11, n. 1, p. 98, 2011.

FAN, G.-W. et al. Anti-inflammatory Activity of Baicalein in LPS-Stimulated RAW264.7 Macrophages via Estrogen Receptor and NF- κ B-Dependent Pathways. **Inflammation**, v. 36, n. 6, p. 1584–1591, 2013.

FENGYANG, L. et al. Stevioside Suppressed Inflammatory Cytokine Secretion by Downregulation of NF- κ B and MAPK Signaling Pathways in LPS-Stimulated RAW264.7 Cells. **Inflammation**, v. 35, n. 5, p. 1669–1675, 2012.

FICHTNER-FEIGL S, STROBER W, GEISLER EK, SCHLITT HJ. Cytokines mediating the induction of chronic colitis and colitis-associated fibrosis. **Mucosal Immunol.**, v. 1, p. S24–S27, 2008.

FILHO, V.C.; YUNES, R.A. Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceito sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Química Nova* 21 (1): 99- 104, 1998.

FLAVELL, D. J. et al. COMPARISON OF THE PERFORMANCE OF ANTI-CD7 IMMUNOTOXINS FOR THE DELIVERY OF SAPORIN TO. v. 13, n. April, p. 185–200, 1995.

FONTES JÚNIOR EA, SOUZA PJ, NASCIMENTO JL, SANTOS SN, ESPINDOLA LS, FERREIRA VM. Antinociceptive and antiinflammatory properties of the ethanolic extract of *Pouteria ramiflora* roots. **Lat Am J Pharm.**, v.28, n.6, p.812-8, 2009.

FREIRE M. O.; VAN DYKE, T.E. Natural resolution of inflammation. **Rev. Periodontol.**, v.63, n.1, p.149-164, 2013.

FUNK, C. D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. **Rev. Science**, v.294, n. 5548, p.1871-5, 2001.

FÜRST, R.; ZÜNDORF, ILSE. Plant-Derived Anti-Inflammatory Compounds: Hopes and Disappointments regarding the Translation of Preclinical Knowledge into Clinical Progress. **Rev. Hindawi Publishing Corporation Mediators of Inflammation**, v. 2014. 146832, 2014.

GAFFEN, S. L. et al. The IL-23–IL-17 immune axis: from mechanisms to therapeutic testing. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 9, p. 585–600, 2014.

GDEK-MICHALSKA, A. et al. Cytokines, prostaglandins and nitric oxide in the regulation of stress-response systems. **Pharmacological Reports**, v. 65, n. 6, p. 1655–1662, 2013.

GREEN, L. C.; LUZURIAGA, K. R.; WAGNER, D. A.; RAND, W.; ISTFAN, N.; YOUNG, V.R.; TANNENBAUM, S. R. Nitrate biosynthesis in man. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, vol. 78, No. 12. p. 7764-7768, 1981.

GRIFFIN GK, NEWTON G, TARRIO ML, BU D-X, MAGANTO-GARCIA E, AZCUTIA V. IL-17 and TNF- α sustain neutrophil recruitment during inflammation through synergistic effects on endothelial activation. **J Immunol**, v.188, n.12, p.6287–99, 2012.

GUO Y, XU F, LU T, DUAN Z, ZHANG Z. Interleukin-6 signaling pathway in targeted therapy for cancer. **Rev. Cancer Treat**, v. 38, p.904–910, 2012.

HAMILTON, A. C. Medicinal plants , conservation and livelihoods. p. 1477–1517, 2004.

HANADA, T.; YOSHIMURA, A. Regulation of cytokine signaling and inflammation. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, vol. 13 p.413-421, 2002.

HEADLAND S. E, NORLING L. V. The resolution of inflammation: Principles and challenges. **Rev. Seminars in Immunology**, v. 27, n.3, p.149-60, 2015.

HEIFETS, L. Centennial of Metchnikoff 's discovery. **Journal of the Reticuloendothelial Society**, v. 31, n.5, p.381-391, 1982.

HENEKA, M. T.; KUMMER, M. P.; LATZ, E. Innate immune activation in neurodegenerative disease. **Nature reviews. Immunology**, v. 14, n. 7, p. 463–77, 2014.

HONG, Y.-H. et al. Anti-Inflammatory Effects of *Siegesbeckia orientalis* Ethanol Extract in *In Vitro* and *In Vivo* Models. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–10, 2014.

JAFARAIN, A.; ASGHARI, G.; GHASSAMI, E. Evaluation of cytotoxicity of *Moringa oleifera* Lam. callus and leaf extracts on Hela cells. **Advanced Biomedical Research**, v. 3, p. 1–5, 2014.

JACOBS, J. F. M. et al. Antigen excess in modern immunoassays: to anticipate on the unexpected. **Autoimmunity reviews**, v. 14, n. 2, p. 160–7, 2015.

JEON, I. H.; MOK, J. Y.; PARK, K.; HWANG, H. M.; SONG, M. S.; LEE, D.; LEE, W.-Y.; CHAI, K. Y.; JANG, S. Inhibitory Effect of Dibutyl Chitin Ester on Nitric oxide and prostaglandin E2 Production in LPS- stimulated Raw 264.7 cells. **Arch Pharm. Res**, vol. 35, N. 7, p.1287-1292, 2012.

JOUNG, E.-J. et al. Anti-inflammatory effect of ethanolic extract from *Myagropsis myagroides* on murine macrophages and mouse ear edema. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 12, n. 1, p. 171, 2012.

JUNG, H. W.; YOON, K.M.; HAN, H.S.; PARK, Y. Hexane fraction of *Zingiberis Rhizoma Crudus* extract inhibits the production of nitric oxide and proinflammatory cytokines in LPS-stimulated BV2 microglial cells via the NF-kappaB pathway. **Food and chemical toxicology**, v.47, p.1190- 1197, 2009.

KACEM, M. et al. Antioxidant and anti-inflammatory effects of *Ruta chalepensis* L. extracts on LPS-stimulated RAW 264.7 cells. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal**, v. 51, n. 2, p. 128–141, 2014.

KALININA, E. V; CHERNOV, N. N.; NOVICHKOVA, M. D. Role of Glutathione, Glutathione Transferase, and Glutaredoxin in Regulation of Redox-Dependent Processes. **Biochemistry (Mosc)**, v. 79, n. 13, p. 1562–1583, 2014.

KENNEDY A, DELEO F. Neutrophil apoptosis and the resolution of infection. **Immunol. Res.**, v. 43, n. 1–3, p. 25–61, 2009.

KIM, H. J.; PARK, G. M.; KIM, J.-K. Anti-inflammatory effect of pristimerin on lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in murine macrophages. **Archives of pharmacal research**, v. 36, n. 4, p. 495–500, 2013.

KIM, A. R. et al. Isolation and Identification of Phlorotannins from *Ecklonia stolonifera* with Antioxidant and Anti-inflammatory Properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 9, p. 3483–3489, 2009.

KIM H. K.; CHEON B.S.; KIM Y. H.; KIM S.Y.; KIM H. P. Effects of naturally occurring flavonoids on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7 and their structure-activity relationships. **Biochem Pharmacol** v.58, p.759–765, 1999.

KORHONEN, R. et al. Nitric oxide production and signaling in inflammation. **Current drug targets. Inflammation and allergy**, v. 4, n. 4, p. 471–479, 2005.

KUMAR V, ABBAS A. K., ASTER J. C. Inflammation and repair. In: Kumar V, Abbas AK, Aster JC, Eds. Robbins Basic Pathology. Philadelphia: Elsevier Saunders;. p 29-73, 2013.

KUMAR, MANI SENTHIL K. T. et al. Anti-inflammatory activity of *Acanthus ilicifolius*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, n. 1, p. 7–12, 2008.

LASKIN D. L.; PENDINO K. J. Macrophages and inflammatory mediators in tissue injury. **Rev. Annu Rev Pharmacol Toxicol.**, v.35, p.655-77,1995.

LAVETI D., M. KUMAR, R. HEMALATHA et al. “Anti-inflammatory treatments for chronic diseases: a review, ” **Inflammation and Allergy-Drug Targets**, vol. 12, no. 5, pp. 349–361, 2013.

LAWRENCE, T.; WILLOUGHBY, D.A.; GILROY, D.W. Anti-inflammatory Lipid Mediators and Insights into the Resolution of Inflammation. **Nature reviews**, vol. 2 n.10, p.787-795, 2002.

LEE M., LEE J., SEO C. et al. "Anti-inflammatory activity of Angelica dahurica ethanolic extract on RAW264.7 cells via upregulation of heme oxygenase-1, " **Food and Chemical Toxicology**, vol. 49, no. 5, p. 1047–1055, 2011.

LEE, H.J.; AHN, B.J.; SHIN, M.W.; CHOI, J.H.; KIM, K.W. Ninjurin1: a potential adhesion molecule and its role in inflammation and tissue remodeling. **Rev. Molecules and cells**, v. 29, n.3, p.223-7, 2010.

LEE, S. H. et al. Selective expression of mitogen-inducible cyclooxygenase in macrophages stimulated with lipopolysaccharide. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 36, p. 25934–25938, 1992.

LEON, L. R.; WHITE, A. A.; KLUGER, M. J. Role of IL-6 and TNF in thermoregulation and survival during sepsis in mice. *Am. J. Physiol.* v. 275, n. 1 pt. 2, p. 269-277, 1998.

LENG, R.-X. et al. IL-19, IL-20 and IL-24: potential therapeutic targets for autoimmune diseases. **Expert opinion on therapeutic targets**, v. 15, n. 2, p. 119–126, 2011.

LEVY BD, CLISH CB, SCHMIDT B, GRONERT K, SERHAN CN. Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. **Rev. Natural Immunology**, v. 2, n.7, p.612-9, 2001.

LI, Q.; VERMA, I. M. NF-kappaB regulation in the immune system. **Nature reviews. Immunology**, v. 2, n. 10, p. 725–34, 2002.

LORENZI H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 4 ed. Nova Odessa. 2006.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. Editora Plantarum, Nova Odessa. 1992.

LUNDTVIG, D. M. S.; IMMENSCHUH, S.; WAGENER, F. A. D. T. G. Heme Oxygenase, Inflammation, and Fibrosis: The Good, the Bad, and the Ugly? **Frontiers in Pharmacology**, v. 3, n. May, p. 1–14, 2012.

LYMAN, M.; LLOYD D.G.; JI, X.; VIZCAYCHIPI, M.P.; MA D. Neuroinflammation: the role and consequences. **Rev. Neuroscience Research**, v.79, p.1-12, 2014.

MA, J. et al. Analysis of polyphenolic antioxidants from the fruits of three Pouteria species by selected ion monitoring liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 5873–5878, 2004.

MALIK, ZA.; BHAT, JA., BALLABHA, R.; BUSSMANN, R.W.; BHATT, A. B. Ethnomedicinal plants traditionally used in health care practices by inhabitants of Western Himalaya. **Rev. Journal of ethnopharmacology**, v. 172, p.133-44, 2015.

MAKAROV, S. S. NF-kappa B in rheumatoid arthritis: a pivotal regulator of inflammation, hyperplasia, and tissue destruction. **Arthritis research**, v. 3, n. 4, p. 200–206, 2001.

MANCINO, A.; LAWRENCE, T. Nuclear Factor- B and Tumor-Associated Macrophages. **Clinical Cancer Research**, v. 16, n. 3, p. 784–789, 2010.

MARKS-KONCZALIK, J.; CHU, S. C.; MOSS, J. Cytokine-mediated Transcriptional Induction of the Human Inducible Nitric Oxide Synthase Gene Requires Both Activator Protein 1 and Nuclear Factor κ B-binding Sites *. v. 273, n. 35, p. 22201–22208, 1998.

MARTIN, H.; OLANDER, B.; NORMAN, M. Reactive hyperemia and interleukin 6, interleukin 8, and tumor necrosis factor-alpha in the diagnosis of early-onset neonatal sepsis. *Pediatrics*. v. 108, n. 4, p. e61, 2001.

MATHESON, G. O. et al. Prevention and management of non-communicable disease: the IOC consensus statement, Lausanne 2013. **British Journal of Sports Medicine**, v. 47, n. 16, p. 1003–1011, 2013.

MATTANA, C. M. et al. Evaluation of cytotoxicity and genotoxicity of Acacia aroma leaf extracts. **TheScientificWorldJournal**, v. 2014, p. 380850, 2014.

MATTILA, J.; THOMAS, A. C. Nitric oxide synthase: non-canonical expression patterns. **Rev. Frontiers in Immunology**, v.5, p. 478, 2014.

MÓCSAI, A.; WALZOG, B.; LOWELL, C. A. Intracellular signalling during neutrophil recruitment. **Cardiovascular Research**, v. 107, n. 3, p. 373–385, 2015.

MONCADA, S., HIGGS, E.A. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. **European Journal of Clinical Investigation**, v.21, n.4, p.361-374, 1991.

MONCADA S., S. H. FERREIRA AND VANE J. R. Prostaglandins, aspirin-like drugs and the oedema of inflammation. **Nature**, v. 246, p.217-219, 1973.

MONTENEGRO L. H. M.; OLIVEIRA P. E. S.; CONSERVA L. M.; ROCHA E. M. M.; BRITO A. C.; ARAÚJO R. M. Terpenóides e avaliação do potencial antimalárico, larvicida, anti-radicalar e anticolinesterásico de *Pouteria venosa* (Sapotaceae). **Rev Bras Farmacogn.**, v. 16(Supl), p. 611-617, 2006.

MOSMANN, T.; Rapid colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to proliferation and cytotoxicity Assays. **Journal of immunological Methods**, vol.65, p. 55-63, 1983.

MOSSER, D. M.; ZHANG, X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. **Immunological reviews**, v. 226, p. 205–18, 2008.

MUELLER, M.; HOBIGER, S.; JUNGBAUER, A.; Anti-inflammatory activity of extracts from fruits, herbs and spices. **Food Chemistry**, vol. 122, p. 987-996, 2010.

MURAKAMI, A. et al. Suppressive effects of okinawan food items on free radical generation from stimulated leukocytes and identification of some active constituents: Implications for the prevention of inflammation-associated carcinogenesis. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 6, n. 4, p. 437–448, 2005.

MYERS, N., MITTERMEIER, R.A., MITTERMEIER, C.G., DA FONSECA, G.A. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, vol.403, p. 853-858, 2000.

NAIR, S.; SINGH, S. V; KRISHAN, A. Flow cytometric monitoring of glutathione content and anthracycline retention in tumor cells. **Cytometry**, v. 12, n. 4, p. 336–42, 1991.

NAM, N. Naturally Occurring NF- B Inhibitors. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v.6, p. 945–951, 2006.

NAPOLITANO, D.R.; MINEO, J.R.; SOUZA, M.A.; PAULA, J.E.; ESPINDOLA, L.S.; ESPINDOLA, F. S. Down-modulation of nitric oxide production in murine macrophages treated with crude plant extracts from the Brazilian Cerrado. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 99, p. 37-41, 2005.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of natural products**, v. 70, n. 3, p. 461–77, 2007.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. The influence of natural products upon drug discovery. **Natural Product Reports**, vol.17, p. 215-234, 2000.

NISHIMOTO, N.; KISHIMOTO, T. Inhibition of IL-6 for the treatment of inflammatory diseases. **Rev. Current Opinion in Pharmacology**, v.4, p.386–391, 2004.

NOVAK, M. L.; KOH, T. J. Macrophage phenotypes during tissue repair. **Journal of leukocyte biology**. v. 93, n. June, p. 875–881, 2013.

OKSMAN-CALDENTEY, K.M.; INZE, D. Plant cell factories in the post-genomic era: New ways to produce designer secondary metabolites. **Trends plant sci.**, vol. 9, p. 433-440, 2004.

OLIVEIRA, T. *et al.* Effect of *Allium cepa* L. on Lipopolysaccharide-Stimulated Osteoclast Precursor Cell Viability, Count, and Morphology Using 4',6-Diamidino-2-phenylindole-Staining. **International Journal of Cell Biology**, v. 2014, p. 535789, 2014.

PEILER, E. *pouteria*: fruits for the future. International Center for underutilized crops, v.11, 2004.

PENNINGTON TD, GARDENS RB, GARDENS K. The genera of Sapotaceae: Royal Botanic Gardens, Kew New York Botanical Garden, Bronx; 1991.

PENG, H. B.; SPIECKER, M.; LIAO, J. K. Inducible nitric oxide: an autoregulatory feedback inhibitor of vascular inflammation. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 161, n. 4, p. 1970–1976, 1998.

PERFEITO, J. P.; SANTOS M. L.; LOPEZ K.S.E.; PAULA J. E.; SILVEIRA D. Characterization and biological properties of *Pouteria torta* extracts: a preliminar study. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 15, n. 3, p. 183–186, 2005.

PERKINS JA. Acute and chronic inflammation. In: Perkins JA, Ed. Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease. Philadelphia: Elsevier Saunders. p 43–77, 2010.

PRUIMBOOM, L.; RAISON, C. L.; MUSKIET, F. A. J. Physical Activity Protects the Human Brain against Metabolic Stress Induced by a Postprandial and Chronic Inflammation. **Behavioural neurology**, v. 2015, p. 569869, 2015.

PYEE, Y.; CHUNG, H.J.; CHOI, T. J; PARK, H.J.; HONG, J-Y.; KIM, JS.; KANG, S.S; LEE, S.K. Suppression of inflammatory responses by handelin, a guaianolide dimer from *Chrysanthemum boreale*, via downregulation of NF- κ B signaling and pro-inflammatory cytokine production. **Rev. Journal of Natural Products**. V.77, n. 4, p.917-924, 2014.

QUEIROZ C. A. C.; CARNEIRO C. E. Estudos Taxonômicos de *Pouteria Aublet* (Sapotaceae) para o Estado da Bahia, Brasil. 2 1. n. 1863, p. 36–39, 2010.

RAO P. P. N.; KNAUS, E. E. Evolution of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): Cyclooxygenase (COX) inhibition and beyond. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 11, n. 2, p. 81–110, 2008.

RATES, S. M. Plants as source of drugs. **Toxicon**, vol.39, n.5, p. 603-613, 2001.

RECIO, C.; ANDÚJAR, I.; RÍOS, J. L. Anti-Inflammatory Agents from Plants: Progress and Potential. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 14, p. 2088–2103, 2012.

REDDY NM, KLEEBERGER SR, KENSLER TW, YAMAMOTO M, HASSOUN PM, REDDY SP. Disruption of Nrf2 Impairs the resolution of hyperoxia-induced acute lung injury and inflammation in mice. **J. Immunol.**, v.182, n.11, p.7264–7271, 2009.

REDDY, S. T.; HERSCHMAN, H. R. Ligand-induced prostaglandin synthesis requires expression of the TIS10/PGS-2 prostaglandin synthase gene in murine fibroblasts and macrophages. **The Journal of biological chemistry**, v. 269, n. 22, p. 15473–80, 1994.

REPETTO, G.; DEL PESO, A.; ZURITA, J. L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. **Nature protocols**, v. 3, n. 7, p. 1125–1131, 2008.

RIBEIRO, D.; FREITAS, M.; LIMA, J.L.F.C.; FERNANDES, E. Proinflammatory Pathways: The Modulation by Flavonoids. **Rev. Medicinal Research Reviews**, v.35, n. p.877-936, 2015.

RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G.A. Prostaglandins and Inflammation. **Rev.** 31, n.5, p.986-1000, 2011.

RISS, T. L.; NILES, A. L.; MINOR, L. Cell Viability Assays Assay Guidance Manual. **Assay Guidance Manual**, p. 1–23, 2004.

ROCK, K. L. et al. The sterile inflammatory response. **Annual review of immunology**, v. 28, n. 3, p. 321–42, 2010.

ROGERIO, A. D. P. et al. The Role of Lipids Mediators in Inflammation and Resolution. **BioMed Research International**.v. 2015, p. 2–4, 2015.

ROGY, M. A. et al. Transfer of interleukin-4 and interleukin-10 in patients with severe inflammatory bowel disease of the rectum. **Human gene therapy**, v. 11, n. 12, p. 1731–1741, 2000.

ROJO, L. E. et al. Wound-healing properties of nut oil from *Pouteria lucuma*. **Journal of cosmetic dermatology**, v. 9, n. 3, p. 185–95, 2010.

ROSSOL, M., H. HEINE, U. MEUSCH, D. QUANDT, C. KLEIN, M.J. SWEET, AND S. HAUSCHILDT. LPS-induced cytokine production in human monocytes and macrophages. **Critical Reviews in Immunology**, v.31, p.379–446, 2011.

SCOTT, A.; KHAN, K. M.; COOK, J.L.; DURONIO, V. What is “inflammation”? Are we ready to move beyond Celsus? **British Journal of Sports Medicine**, v. 38, n.3, p. 248–249, 2004.

SEKHAR, S.; SAMPATH-KUMARA, K. K.; NIRANJANA, S. R.; PRAKASH, H. S. Attenuation of reactive oxygen/nitrogen species with suppression of inducible nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages by bark extract of *Buchanania lanzan*. **Pharmacognosy magazine**, v. 11, n. 42, p. 283-291, 2015.

SIGMA-ALDRICH. Cell Counting Kit - 8 General information BioChemika. v. 8, n. December, p.8–11,2006. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Datasheet/6/96992dat.pdf>.

SIGMA-ALDRICH. Kit Glutathione Technical bulletin. p. 5–8, [s.d.]. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Bulletin/cs0260bul.pdf>.

SILVA, C. A.; SIMEONI, L. A.; Silveira, D. Genus *Pouteria*: Chemistry and biological activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, vol. 19, p. 501-509, 2009.

SILVA, C. A. M. Contribuição ao estudo químico e biológico de *Pouteria gardnerii*, Brasília, Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília, 2007.

SIVAMANI, R. K. Eicosanoids and Keratinocytes in Wound Healing. **Rev. Advances In Wound Care**, v. 3, n.7, 2014.

SONG, M.; PARK, H.-J. Anti-inflammatory effect of *Phellinus linteus* grown on germinated brown rice on dextran sodium sulfate-induced acute colitis in mice and LPS-activated macrophages. **Journal of ethnopharmacology**, v. 154, n. 2, p. 311–8, 2014.

SOUZA, P. M.; ELIAS, S.T.; SIMEONI, L.A.; PAULA, J.E.; GOMES, S.M.; GUERRA, E.N.S.; FONSECA, Y. M.; SILVA, E. C.; SILVEIRA, D.; MAGALHÃES, P. O. Plants from Brazilian Cerrado with Potent Tyrosinase Inhibitory Activity. **Plos One**, vol. 7, p. E48589, 2012.

SOZZANI S, ABBRACCHIO MP, ANNESE V, DANESE S, DE PITA O, DE SARRO G. Chronic inflammatory diseases: do immunological patterns drive the choice of biotechnology drugs? A critical review. **Autoimmunity**, v. 47, n. 5, p. 287–306, 2014.

SU, K.-Y. et al. 3,4-Dihydroxytoluene, a metabolite of rutin, inhibits inflammatory responses in lipopolysaccharide-activated macrophages by reducing the activation of NF-κB signaling. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 14, n. 1, p. 21, 2014.

SURH, Y.-J. et al. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF-κB activation. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 480-481, p. 243–268, 2001.

SWENSON, U.; ANDERBERG, A. A. Phylogeny, character evolution, and classification of Sapotaceae (Ericales). **Cladistics**, v. 21, n. 2, p. 101–130, 2005.

TAKANO-ISHIKAWA Y, GOTO M, YAMAKI K. Structure-activity relations of inhibitory effects of various flavonoids on lipopolysaccharide-induced prostaglandin E2 production in rat peritoneal macrophages: comparison between subclasses of flavonoids. **Phytomedicine**, v.13, p.310–317, 2006.

TALL, A. R.; YVAN-CHARVET, L. Cholesterol, inflammation and innate immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 2, p. 104–116, 2015.

THOMPSON, C. D. et al. The Therapeutic Role of Interleukin-10 after Spinal Cord Injury. **Journal of neurotrauma**, v. 1324, p. 1311–1324, 2013.

TONDER V., A.; JOUBERT, A. M.; CROMARTY, A. Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. **BMC Research Notes**, v. 8, n. 1, p. 47, 2015.

TANER, G. et al. Assessment of the cytotoxic, genotoxic, and antigenotoxic potential of Pycnogenol® in in vitro mammalian cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 61, p. 203–208, 2013.

TONG, L. et al. Anti-inflammatory activity of omphalocarpin isolated from Radix Toddaliae Asiaticae. **Journal of ethnopharmacology**, v. 155, n. 3, p. 1553–60, 2014.

TRIONO, T.; BROWN A. H. D.; WEST J. G. A phylogeny of *Pouteria* (Sapotaceae) from Malasia and Australasia. **Aust. Syst. Bot.**, v. 20, p.107-118, 2007.

VANE J. R. The fight against rheumatism: from willow bark to COX-1 sparing drugs. **J Physiol Pharmacol**, v. 51, p.573-586, 2000.

VANE J. R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol*, 43:232-235, 1971. [3]. J. R. Vane. The mode of action of aspirin and similar compounds. **J Allergy Clin Immunol**, v.58, p.691-712, 1976.

VERES, B. Anti-Inflammatory Role of Natural Polyphenols and Their Degradation Products. **Severe Sepsis and Septic Shock - Understanding a Serious Killer**, v. 1, p. 379–410, 2012.

YING, X.; YU K.; CHEN, X.; CHEN, H.; HONG, J.; CHENG, S.; PENG, L. Piperine inhibits LPS induced expression of inflammatory mediators in RAW 264.7 cells. **Cellular immunology**, v. 285, p. 49-54, 2013.

YOSHIDA, Y.; TANAKA, T. Interleukin 6 and rheumatoid arthritis. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 698313, 2014.

ZAROGOULIDIS P.; YARMUS L.; DARWICHE, K.; WALTER R.; HUANG H.; LI Z.; ZARIC B.; TSAKIRIDIS K. Interleukin-6 Cytokine: A multifunctional Glycoprotein for cancer. **National Institutes of Health**. v. 9, n. 62, p. 1–11, 2013.

ZHOU, R. et al. Anti-inflammatory activity of guluronate oligosaccharides obtained by oxidative degradation from alginate in lipopolysaccharide-activated murine macrophage RAW 264.7 cells. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 63, n.1, p. 160-8, 2015.